

Aus dem Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde,  
Professur für Milchwissenschaften der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Phäno- und genotypische Charakterisierung von  
*Streptococcus agalactiae* (Lancefield-Serogruppe B),  
isoliert von subklinischen Rindermastitiden**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades beim  
Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von  
KRISTIN FINK

Gießen 2002



Aus dem Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde,  
Professur für Milchwissenschaften der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Christoph Lämmler

**Phäno- und genotypische Charakterisierung von  
*Streptococcus agalactiae* (Lancefield-Serogruppe B),  
isoliert von subklinischen Rindermastitiden**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades beim  
Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von  
KRISTIN FINK  
Tierärztin aus Rostock

Gießen 2002



Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität

Dekan: **Prof. Dr. Dr. h. c. B. Hoffmann**

---

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Ch. Lämmle

2. Berichterstatter: PD Dr. Dr. G. Reiner

Tag der mündlichen Prüfung: 4. November 2002



*Meiner Mutter und dem Andenken meines Vaters*

*Für Fritz*





	<b>Seite</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2. Literaturübersicht</b>	<b>3</b>
2.1 Geschichtlicher Überblick und taxonomische Einordnung	3
2.2 Vorkommen von B-Streptokokken bei Tier und Mensch	5
2.2.1 Bedeutung als Mastitiserreger des Rindes	5
2.2.1.1 Epidemiologie	5
2.2.1.2 Prävalenz	8
2.2.1.3 Klinische Symptomatik	10
2.2.1.4 Pathologisch-anatomische Veränderungen	12
2.2.1.5 Diagnose	13
2.2.1.6 Therapie und Herdensanierung	14
2.2.1.7 Prognose	21
2.2.1.8 Prophylaxe	22
2.2.2 Vorkommen bei anderen Tierarten	24
2.2.3 Erkrankungen beim Menschen	25
2.2.4 Bedeutung von <i>S. agalactiae</i> als Zoonoseerreger	29
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>32</b>
3.1 Bakterienkulturen	32
3.2 Anzuchtungsmedien	35
3.3 Konventionelle Identifizierung	37
3.3.1 Kulturmorphologie und Hämolyseformen	37
3.3.2 CAMP-Test	38

	<b>Seite</b>
3.3.3 Biochemische Reaktionen	38
3.3.3.1 Abbau von Kohlenhydraten	38
3.3.3.2 Hydrolyse von Esculin	39
3.3.3.3 Hydrolyse von Natrium-Hippurat	39
3.3.4 Serologische Gruppenbestimmung	39
3.3.4.1 Extraktion des Gruppenantigens	39
3.3.4.2 Doppelimmundiffusion nach Ouchterlony	40
3.3.4.3 Staphylokokken-Koagglutination	41
3.4 Molekulare Identifizierung mittels Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR)	42
3.4.1 PCR-Analyse des 16S rRNA-Gens	42
3.4.1.1 Präparation der bakteriellen DNA	42
3.4.1.2 Amplifizierung eines speziesspezifischen Abschnitts des 16S rRNA-Gens	43
3.4.1.3 Agarosegelelektrophorese	44
3.4.1.4 Ethidiumbromidfärbung	44
3.4.2 Amplifizierung der 16S-23S rDNA „intergenic spacer“-Region	45
3.4.3 Amplifizierung eines speziesspezifischen Abschnitts der 16S-23S rDNA „intergenic spacer“-Region	45
3.4.4 Amplifizierung des CAMP-Faktor-Gens ( <i>cfb</i> )	46
3.5 Phäno- und genotypische Charakterisierung	46
3.5.1 Typisierung	46
3.5.1.1 Extraktion der Typenantigene	46
3.5.1.2 Absorption der Antiseren	47
3.5.1.3 Nachweis der Typenantigene	49

		Seite
3.5.1.3.1	Doppelimmundiffusion nach Ouchterlony	49
3.5.1.3.2	Staphylokokken-Koagglutination	49
3.5.1.4	PCR-vermittelter Nachweis des Proteinantigen Rib-Gens ( <i>rib</i> )	49
3.5.1.5	PCR-vermittelter Nachweis des Proteinantigen c $\beta$ -Gens ( <i>bag</i> )	50
3.5.2	Pigmentbildung	50
3.5.3	Untersuchung der Wachstumseigenschaften	51
3.5.3.1	Wachstum in Flüssigmedium	51
3.5.3.2	Wachstum in Softagar	51
3.5.4	Untersuchung der Oberflächenhydrophobizität	52
3.5.4.1	Salz-Aggregationstest (SAT)	52
3.5.4.2	Hexadecan-Adhärenztest	52
3.5.5	Nachweis hämagglutinierender Eigenschaften	53
3.5.5.1	Gewinnung der Erythrozyten	53
3.5.5.2	Hämagglutinationstest	54
3.5.6	Analyse des Enzyms Hyaluronidase	54
3.5.6.1	Dekapsulationstest	54
3.5.6.2	PCR-vermittelter Nachweis des Hyaluronidase-Gens ( <i>hy/B</i> )	55
3.5.6.3	PCR-Analyse des Insertionselementes IS <i>1548</i>	56
3.5.7	Nachweis von Antibiotikaempfindlichkeiten	56
3.6	DNA-„Fingerprinting“	57
3.6.1	Präparation der bakteriellen DNA	57
3.6.2	Restriktionsverdau der Gesamtzell-DNA	59
3.6.3	Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)	60

	<b>Seite</b>
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>62</b>
4.1 Identifizierung der Kulturen	62
4.2 Phäno- und genotypische Charakterisierung	70
<b>5. Diskussion</b>	<b>94</b>
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>128</b>
<b>7. Summary</b>	<b>129</b>
<b>8. Literaturverzeichnis</b>	<b>130</b>

## 1. Einleitung

Die häufigsten Abgangsursachen bei Milchkühen sind Eutergesundheits- und Fruchtbarkeitsstörungen. Allein durch subklinische Mastitiden, die wesentlich häufiger auftreten als klinische Mastitiden, entstehen den Milcherzeugerbetrieben in der Bundesrepublik Deutschland wirtschaftliche Einbußen von jährlich 1 bis 2 Milliarden DM (SOBIRAJ et al., 2000). Diese werden in erster Linie durch einen deutlichen Leistungsrückgang bei den betroffenen Milchkühen verursacht. Ein zweiter wichtiger Aspekt ist die Veränderung der Zusammensetzung der Milch und die Minderung ihrer technologischen Wertigkeit (HEESCHEN, 1996).

*Streptococcus agalactiae*, die einzige Spezies der serologischen Lancefield-Gruppe B, ist der Verursacher des seit Mitte des 19. Jahrhunderts bekannten, seuchenhaft auftretenden „Gelben Galts“, einer zumeist subklinischen Mastitis des Rindes, die im weiteren Verlauf in eine chronisch-katarrhalische Mastitis übergehen kann. Obwohl Euterinfektionen mit *S. agalactiae* aufgrund der guten Therapierbarkeit von abnehmender Bedeutung sind (KLOPPERT et al., 1999; SOBIRAJ et al., 2000), gibt es im Bundesland Hessen immer wieder einige Betriebe, bei denen dieser Mastitiserreger im Untersuchungsmaterial nachweisbar ist, das heißt eine vollständige Tilgung aus hessischen Milchviehbeständen wurde bislang noch nicht erreicht.

Seit einigen Jahrzehnten ist *S. agalactiae* in der Humanmedizin vor allem als Erreger neonataler Meningitiden und Septikämien, aber auch als Verursacher unterschiedlichster Erkrankungen Erwachsener bekannt (JELINKOVA, 1977; BRANDIS et al., 1994; SCHUCHAT, 1998; HAHN et al., 1999). Die Bezeichnungen *S. agalactiae* und B-Streptokokken werden synonym verwendet. Dabei werden

veterinärmedizinische Isolate üblicherweise als *S. agalactiae* bezeichnet, wohingegen in der Humanmedizin die Bezeichnungen B-Streptokokken bzw. Gruppe B-Streptokokken (GBS) üblich sind.

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, Mastitiserreger, isoliert aus Viertelgemelksproben hessischer Milcherzeugerbetriebe, mit Hilfe konventioneller und auch molekularbiologischer Untersuchungsverfahren als *S. agalactiae* zu identifizieren. Daran schloss sich eine weitergehende phäno- und genotypische Charakterisierung der Erreger an. Dies sollte Aufschluss über mutmaßlich epidemiologische Beziehungen und die mögliche Verbreitung einzelner Bakterienstämme in den jeweiligen Milcherzeugerbetrieben geben.

## 2. LITERATURÜBERSICHT

### 2.1 Geschichtlicher Überblick und taxonomische Einordnung

Der durch *Streptococcus agalactiae* hervorgerufene sogenannte „Gelbe Galt“, in der Schweiz auch als „Gälti“ oder „böse Euterstrauchete“ bezeichnet, stellt eine besondere Form der Euterentzündung dar, die seit der Mitte des 19. Jahrhunderts bekannt ist. Der Name „Gelber Galt“ leitet sich nach BUSEMAN (1964) von der gelblichen Verfärbung und dem allmählichen Versiegen („Vergalten“) der Milch ab. Seltener wird auch die Bezeichnung „Kalter Galt“ verwendet. Diese hochkontagiöse Mastitis wurde erstmals von den drei schweizer Tierärzten GATTIKER (1848), BRENNWALD (1848) und RAST (1854) eingehender untersucht. Diese brachten die Euterentzündung allerdings noch nicht mit einer Streptokokkeninfektion in Zusammenhang, sondern gingen von verschiedenen haltungsbedingten Ursachen aus. BILLROTH entdeckte im Jahre 1874 kettenbildende Kokken, die er mit dem Terminus *Streptococcus* beschrieb. FRANK (1876) rief mit der Instillation von Milch einer infizierten Kuh in das Euter einer gesunden Kuh bei dieser dieselben Symptome einer Galtmastitis hervor, womit der Beweis der Infektiosität erbracht war. Aus einer seuchenhaft auftretenden Mastitisepizootie isolierten NOCARD und MOLLEREAU (1887) Bakterien, die sie zunächst *Streptococcus nocardii*, später „*Streptococcus de la mammitis*“ nannten und für die „infektiöse Induration des Euters“ bei Kühen verantwortlich machten. HESS und BORGEAUD (1889) sowie GUILLEBEAU (1890) bezeichneten diesen Erreger als *Streptococcus mastitidis contagiosa*. Zur Einführung des Namens *Streptococcus mastitidis et agalactiae contagiosa* kam es 1893 durch KITT. Von LEHMANN und NEUMANN (1896) wurden die Galterreger erstmals als *Streptococcus agalactiae* bezeichnet; MIGULA prägte im Jahre 1900 für dieselbe Spezies die Benennung *Streptococcus mastitidis*.

Die wissenschaftliche Erforschung der Galtstreptokokken begann mit der Anzüchtung von Reinkulturen durch ROSENBAACH (1884). Der Beginn des 20. Jahrhunderts war laut HARDIE und WHILEY (1997) durch bedeutende technische Entwicklungen gekennzeichnet, die andere Forschungsansätze möglich machten. Hieraus ergaben sich

neue Methoden zur Klassifizierung der Streptokokken, z. B. durch den Nachweis unterschiedlicher Hämolysereaktionen auf Blutagar, die Feststellung verschiedener biochemischer Reaktionen und des sogenannten C-Polysaccharids, eines Antigens in der Zellwand der Streptokokken, das durch LANCEFIELD (1933) zur serologischen Gruppenbestimmung herangezogen wurde.

Seit der Erstbeschreibung von *S. agalactiae* erfuhr das Genus *Streptococcus* eine Reihe von Wandlungen. So etablierten SHERMAN (1937) sowie SHERMAN und OBIGER (1938) unter Berücksichtigung kultureller, biochemischer und serologischer Eigenschaften ein viele Jahre anerkanntes Klassifikationsschema für Streptokokken, in welchem das Genus in die vier Hauptgruppen Pyogen-, Viridans- und Lactisstreptokokken sowie Enterokokken unterteilt wurde. Die Gruppe der Pyogenstreptokokken umfasste deutlich  $\beta$ -hämolisierende Streptokokken, die ein Lancefield-Gruppenantigen besaßen, unter anderem auch *S. agalactiae*, von SHERMAN (1937) noch als *S. mastitidis* bezeichnet. BRIDGE und SNEATH (1983) teilten die Pyogenstreptokokken in die Untergruppe der B-Streptokokken des Menschen und eine weitere Untergruppe mit den Spezies *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. equi* und *S. equisimilis* ein. Seit Mitte der 80er Jahre des 20. Jahrhunderts war die Forschung hinsichtlich der Klassifizierung der Streptokokken geprägt von modernen Methoden, wie Nukleinsäurehybridisierungen und vergleichenden Gensequenzanalysen (BUSSE et al., 1996). Aufgrund entsprechender Untersuchungen durch SCHLEIFER und KILPPER-BÄLZ (1984) sowie SCHLEIFER et al. (1985) kam es zu einer Neuordnung des Genus *Streptococcus* in die Gattungen „*Streptococcus sensu stricto*“, „*Enterococcus*“ und „*Lactococcus*“. ROTTA (1986) zählte *S. agalactiae* zu den Pyogenstreptokokken innerhalb der Gattung „*Streptococcus sensu stricto*“. SCHLEIFER und KILPPER-BÄLZ (1987) stellten eine enge Verwandtschaft der B-Streptokokken mit Streptokokken der Serogruppe M fest und schlugen ebenso eine Zuordnung von *S. agalactiae* zu der erweiterten Gruppe der Pyogenstreptokokken vor. Vergleichende Sequenzanalysen der 16S rRNA verschiedener Streptokokkenspezies durch BENTLEY et al. (1991) zeigten in hohem Maße Übereinstimmungen zwischen *S. agalactiae* und *S. pyogenes*. Nach HARDIE und WHILEY (1997) wurden neben *S. agalactiae* außerdem *S. canis*, *S. dysgalactiae*, *S. hyointestinalis*, *S. iniae*, *S. parauberis*, *S. porcinus* und *S. uberis* zu den Pyogenstreptokokken gerechnet. *S. agalactiae* erwies



sich als die einzige Spezies innerhalb der serologischen Gruppe B (DEVRIESE, 1991). Eine aktuelle Übersicht über die Taxonomie der Streptokokken bietet das Internet (<http://www.bacterio.cict.fr>).

## **2.2 Vorkommen von B-Streptokokken bei Tier und Mensch**

### **2.2.1 Bedeutung als Mastitiserreger des Rindes**

#### **2.2.1.1 Epidemiologie**

Der durch *S. agalactiae* hervorgerufene „Gelbe Galt“ ist eine spezifische, kontagiöse Euterentzündung des Rindes, die in allen Ländern mit intensiver Milchwirtschaft vorkommt (LÄMMLER und HAHN, 1994). Innerhalb der Mastitiden wird zwischen der klinischen und der subklinischen Form unterschieden. Während die klinische Mastitis mit offensichtlichen Entzündungssymptomen einhergeht, ist die subklinische Mastitis nur durch verminderte Milchleistung, erhöhte Zellgehalte und in den meisten Fällen durch die Nachweisbarkeit von bakteriellen Erregern gekennzeichnet. Alle Mastitiden haben einen großen Einfluss auf die substantielle Zusammensetzung und technologische Wertigkeit der Milch. Durch *S. agalactiae* hervorgerufene Euterentzündungen sind in der Regel ein Bestandsproblem (KEEFE, 1997). Schon ZIEGER (1932), NITSCH (1948) und GÖTZE (1950) rechneten die Galtmastitis zu den sogenannten Leistungskrankheiten, die bei Tieren mit einer hohen Laktationsleistung eher zum Ausbruch kommt als bei solchen mit einer niedrigen Milchleistung. Als prädisponierende Faktoren für das Entstehen einer Galtmastitis erwiesen sich nach HAMANN (1989) ungünstige Euterformen, wie Hänge- oder Stufeneuter, trichterförmige Zitzenöffnungen oder ein zu weiter oder zu kurzer Strichkanal. After- und Beistriche können Erregerreservoir sein und das Infektionsrisiko erhöhen. Euterhautrekrankungen wie Warzen, Pocken oder Ekzeme führen schmerzbedingt zur sogenannten Schwermelkigkeit und somit zu einem

schlechten Ausmelkgrad. Dies steigert das Erkrankungsrisiko. Allgemein- und Stoffwechselerkrankungen bergen nach HAMANN (1989) ein hohes Mastitisrisiko, ebenso Verletzungen. Prädestiniert hierfür sind auch tiefhängende Euter. HEJLICEK (1994) berichtete von einer nachgewiesenen genetisch oder rassebedingten Resistenz bzw. Anfälligkeit gegenüber einer Galtmastitis. Nach HAMANN (1989) gehören zu den Einflussfaktoren bei der Entstehung einer Mastitis außerdem das Alter und das Laktationsstadium einer Kuh. Je älter das Tier ist, um so größer ist die Anfälligkeit. Wie HAMANN und KRÖMKER (1999) berichteten, erwies sich das physiologische Gleichgewicht vor allem bei Hochleistungskühen in erster Linie in der Frühlaktation aufgrund hormoneller, metabolischer und zytologischer Umstellungsprozesse als sehr labil. Nach Angaben der Autoren ist die Mastitisneuerkrankungsrate in diesem Stadium drei- bis fünfmal höher als in den übrigen Laktationsabschnitten. Besonders gefährdet scheinen Kühe aber auch während der letzten Laktationswochen sowie in den ersten Wochen der Trockenperiode zu sein.

Nach SEELEMANN (1932a) erwies sich die infizierte Milchdrüse als eigentliches Reservoir von *S. agalactiae*. Der Autor ging davon aus, dass es sich bei *S. agalactiae* um einen obligaten Keim der Milchgänge des Kuheuters handle, der in anderen Organen oder im Blut nicht zu finden sei. Der Galterreger kann nach GROSSENBACHER (1951) nur im Euter für längere Zeit überleben, so dass infizierte, unbehandelte Färsen und Kühe als Infektionsquelle innerhalb einer Herde fungieren können. Die Infektion des Euters geschieht auf dem galaktogenen Wege, das heißt *S. agalactiae* gelangt über den Strichkanal in die Milchdrüse. Dies wurde bereits von ZSCHOKKE (1893), BIDDOCH und RADWAY (1904), RULLMANN und TROMMSDORF (1906) sowie GÖTZE (1928) erkannt. Auch SCHULZ (1994) war der Überzeugung, dass der galaktogene Weg der einzige Infektionsweg für *S. agalactiae* ist. Der Autor berichtete, dass der Fortgang der Infektion nach der Überwindung der Infektionsbarriere im Bereich der Zitzenkuppe abhängig von der individuellen Effizienz der immunologischen Abwehr des betroffenen Tieres sei. Der durch elastisch-muskulöses Gewebe verschlossene Strichkanal stellt die erste Barriere der Euterabwehr dar. In zweiter Linie beruht die Abwehr auf dem Ausspüleffekt des nach außen gerichteten Milchstroms. Ist der Erreger trotzdem über den Strichkanal in das Euter eingedrungen, breitet sich die Infektion von den distalen Teilen der Milchdrüse

kanalikulär in höher gelegene Milchgänge und in die Alveolen aus. Laut SCHULZ (1994) findet an den Epithelien die erste intramammäre Auseinandersetzung zwischen Wirtsorganismus und Erreger statt. FOX und GAY (1993) beschrieben als weiteren wichtigen Bestandteil der Abwehr einer *S. agalactiae*-Infektion die zelluläre Abwehr durch lymphatische Zellen, unter anderem durch polymorphkernige neutrophile Granulozyten, die sich in den Wänden der Zitzen- und Drüsenzisterne sowie der Milchgänge ansammeln. Bei intensiver Abwehrreaktion der Milchdrüse und intaktem Epithel der Zisternen kann die Infektion getilgt werden. Zumeist werden jedoch nicht alle Keime vernichtet. Die Reduktion ihrer Zahl vermindert aber die Irritation des Drüsengewebes, so dass die Zahl der Abwehrzellen wieder sinkt. Die Erreger können sich erneut vermehren. Daraus resultieren wieder erhöhte Zellzahlen in der Milch. Diese Schwankungen sind in Abständen von sieben bis zehn Tagen zu beobachten. Aufgrund dieser diskontinuierlichen *S. agalactiae*-Ausscheidung kann eine einmalige bakteriologische Milchuntersuchung unter Umständen ein falsch-negatives Ergebnis liefern. Zu der zellulären Abwehr kommt nach SCHULZ (1994) bei der Galtmastitis eine Vielzahl geweblicher Reaktionen als Antwort auf die Entzündungsreize wie Hyperämie, Exsudation und Proliferation. Später treten Atrophie und bindegewebiger Ersatz des Drüsengewebes auf. Das Eutersekret selbst verfügt über bakterizide bzw. bakteriostatische Substanzen aufgrund von Makrophagentätigkeit, wie z. B. Lactoferrin, Lysozym, das Lactoperoxidase-Thiozyanat-Wasserstoffperoxid-System und weitere Resistenzfaktoren, wie Komplement, Properdin und Opsonine. Bei der Infektion durch *S. agalactiae* verläuft die Mastitis protrahiert über zahlreiche klinisch mehr oder weniger manifeste Schübe. Der Erreger besitzt eine epithelschädigende und teilweise auch leukotaktische Wirkung, so dass man zu Beginn der Erkrankung eine recht starke primäre Schädigung des Alveolarepithels vorfindet. Laut SCHULZ (1994) kommt es frühzeitig zu einer starken Immigration von neutrophilen Granulozyten in die Alveolen, wo sie jedoch hauptsächlich mit der Phagozytose von Milchbestandteilen, wie Fetten und Kaseinen und nur zu einem geringen Teil mit der Phagozytose der Erreger beschäftigt sind. Bei Fortbestehen der Alveolarepithelschädigung durch *S. agalactiae* tritt eine Atrophie des Alveolarepithels auf, wodurch eine Verkleinerung der Alveolen und eine Reduktion oder komplette Einstellung der Milchsekretion in den betroffenen Drüsenläppchen verursacht wird. Zur gleichen Zeit setzen spezifische

Abwehrmechanismen aufgrund des Antigenreizes durch den Erreger ein. Diese äußern sich in Form von Einwanderung und Vermehrung von Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen.

EDMONDSON (1989) und BARKEMA et al. (1997) stellten fest, dass B-Streptokokken, die sich in der Milchdrüse vermehren, beim Melkvorgang mit der Milch ausgeschieden wurden und durch alles, was durch diese Milch kontaminiert wurde, wie z. B. die Melkgerätschaften und die Hände der Melker, von Tier zu Tier übertragen werden konnten. Erste Infektionsversuche wurden bereits von NOCARD und MOLLEREAU (1887) durchgeführt. Die Forscher übertrugen Galtstreptokokken, die sie aus der Milch infizierter Kühe isoliert hatten, über die Zitzen in die Euter gesunder Kühe und konnten dadurch experimentell eine Infektion hervorrufen. KLEIN, KLECKNER und SCHEIDY (1938) wiesen *S. agalactiae* allerdings bereits in Eutern von Färsen nach. Die Autoren untersuchten Rinder, die als Kälber große Mengen Galtmilch aufgenommen hatten. Der Erreger besiedelte die Tonsillen und konnte bei Gruppenhaltung der Kälber durch gegenseitiges Besaugen auf die juvenile Milchdrüse übertragen werden. Diese Erkenntnisse wurden von OHM (1958) sowie KLEINSCHROTH et al. (1994) bestätigt.

Die Lebensfähigkeit der Galtstreptokokken außerhalb der Milchdrüse untersuchten JONES (1918), BRYAN (1934) sowie PLASTRIDGE (1946), welche den Erreger aus der Einstreu, von den Melkgerätschaften und den Händen des Melkpersonals isolieren konnten. WATTS (1945) stellte fest, dass *S. agalactiae* außerhalb des Kuheuters um so länger lebensfähig blieb, je trockener das Milieu war, in dem er sich befand. INGALLS und JOHNSON (1947) fanden heraus, dass sich Galtstreptokokken auf der Zitzenhaut nicht länger als fünf Tage nach dem letzten Melken nachweisen ließen.

#### 2.2.1.2 Prävalenz

In präantibiotischer Zeit erwies sich *S. agalactiae* als einer der Haupterreger für Mastitiden (KEEFE, 1997). In der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts waren häufig 50 – 60 % der Kühe einer Herde mit *S. agalactiae* infiziert (FOX und

GAY, 1993). Von SCHÖNBERG (1950) wurde der „Gelbe Galt“ als die mit 80 % häufigste Mastitisform in Deutschland in den 40er und 50er Jahren des 20. Jahrhunderts bezeichnet. Der Autor bezifferte den Verseuchungsgrad der großen Betriebe mit 70 %, den der mittleren Betriebe mit 25 % und den der kleinen Betriebe mit ca. 2 %. Selbst in Vorzugsmilchbetrieben konnte *S. agalactiae* in 20 - 85 % der Milchproben nachgewiesen werden (BUSEMAN, 1964). Mit der Einführung des maschinellen Milchentzugs und einer umfangreichen antibiotischen Mastitistherapie verlor nach FUNK et al. (1982) *S. agalactiae* als Mastitiserreger an Bedeutung. GONZÁLEZ et al. (1986) berichteten jedoch von einem Projekt, in dem 50 Milchviehherden in Kalifornien auf Mastitiserreger hin untersucht wurden, wobei in 47 Herden *S. agalactiae* nachgewiesen werden konnte. In sieben der 50 Herden waren bis zu 45 % der Kühe infiziert. BARTLETT et al. (1992) untersuchten 48 Milchviehherden in Ohio, von denen 27 Herden (56 %) mit *S. agalactiae* infiziert waren. SISCHO et al. (1993) schilderten, dass vor Einführung des Mastitis-Kontroll-Programms in den USA durch das „National Mastitis Council“ im Jahre 1987 in etwa der Hälfte aller Milchviehherden *S. agalactiae* isoliert worden war. Durch dieses Bekämpfungsprogramm wurde die Herdenprävalenz in einigen Regionen des Landes auf unter 15 % gesenkt. In Milchviehbeständen der kanadischen Insel Prince Edward stellten KEEFE et al. (1997) bei Untersuchungen im Jahr 1992 eine Herdenprävalenz von 17,7 % und im Jahr 1994 von 13,1 % für *S. agalactiae* fest. HEJLICEK (1994) berichtete von Untersuchungen über den Verseuchungsgrad der Milchviehbestände mit *S. agalactiae*. Den Angaben des Autors zufolge waren im Jahr 1983 13 % aller Milchkühe sowohl in der BRD als auch in Portugal, 1987 55,2 % der Kühe in Ägypten und 27 % der Milchkühe in Polen, im Jahr 1989 27 % aller Milchkühe in der DDR, 26 % der Kühe in den USA, 7,2 % der Milchkühe in der Schweiz sowie 6,4 % aller Kühe in der Tschechoslowakei und 1990 4,4 % der Milchkühe in Österreich mit dem Galterreger infiziert. WOLTER et al. (1999) beobachteten im Bundesland Hessen nach der Einführung von Präventiv- und Kontrollmaßnahmen einen deutlichen Rückgang der durch *S. agalactiae* hervorgerufenen Mastitiden. Der Erreger konnte jedoch aus größeren zusammenhängenden Rinderpopulationen bisher nicht vollständig eliminiert werden. KLOPPERT et al. (1999) publizierten Daten des Eutergesundheitsdienstes des Bundeslandes Hessen, aus denen hervorgeht, dass *S. agalactiae* im Jahr 1995 in 1,7 %

aller untersuchten Viertelgemelksproben nachgewiesen werden konnte. Die Isolierungsrate sank bis zum Jahr 1998 um rund 94 % auf 0,1 %. Die Autoren schätzten, dass in Hessen noch etwa 0,5 % aller Betriebe und 0,3 % aller Milchkühe mit *S. agalactiae* infiziert sind. Vergleichbare Untersuchungsergebnisse liegen aus der Schweiz vor (BUSATO et al., 2000). Die Autoren fanden bei ihren Untersuchungen über subklinische Mastitiden in 152 biologisch geführten Milchviehbetrieben in der Schweiz für *S. agalactiae* eine Prävalenz von 0,8 %.

### 2.2.1.3 Klinische Symptomatik

Die Mastitis ist nach SCHULZ (1994) eine Entzündung der Milchdrüse in der Gesamtheit ihrer milchbildenden, speichernden und ableitenden Abschnitte. Sie kann sich in einer akuten oder chronischen Verlaufsform zeigen und als klinisch manifeste oder subklinische Mastitis auftreten. Bei den klinischen Euterentzündungen unterscheidet man zwischen drei Verlaufsformen. Die subakute Mastitis ist durch einen verhältnismäßig milden und häufig schleichenden Krankheitsverlauf gekennzeichnet, wobei das Allgemeinbefinden des betroffenen Tieres ungestört ist. Eine akute Mastitis geht mit ausgeprägten Entzündungserscheinungen einher. Häufig kommt es zu schwerwiegenden Allgemeinerkrankungen, wie Festliegen, Fieber, Pansenstillstand, Durchfall oder ähnlichem. Im Verlauf dieses schweren Krankheitsbildes können das betroffene Viertel oder größere Anteile der Milchdrüse irreversibel geschädigt werden. Eine akute Mastitis kann nach SCHULZ (1994) schließlich in die chronische Verlaufsform übergehen. Dabei handelt es sich um eine länger andauernde, zumeist schleichende Form, die ohne Störung des Allgemeinbefindens einhergeht. Die sinnfälligen Veränderungen der Milch können bis auf kleine Flocken verschwinden. Allerdings behält die Milch oft einen bläulich-wässrigen Charakter. Der Zellgehalt ist immer erhöht und die Milchleistung vermindert. Die Erreger können häufig in den chronisch entzündeten Gewebebezirken überleben (KLEINSCHROTH et al., 1994). ROLLE und MAYR (1993) definierten die subklinische Mastitis als eine Infektion, die ohne Krankheitssymptome bzw. ohne erkennbare Schädigung des befallenen

Wirtsorganismus auftritt und akut oder chronisch verlaufen kann. Innerhalb dieser klinisch inapparenten Euterentzündung wird pathogenetisch zwischen den subklinischen und den persistierenden Infektionen unterschieden. Bei der subklinischen Infektion handelt es sich nach Meinung der Autoren um ein Geschehen, bei dem der Übergang von der Infektion zur Krankheit durch eine starke Wirtsabwehr verhindert wird. Die subklinische Infektion ist stets zeitlich begrenzt. Allerdings kann aus dieser Form der klinisch inapparenten Infektion jederzeit eine klinisch apparente Erkrankung werden, wenn der Wirtsorganismus in seiner Abwehr durch verschiedenste Stressfaktoren geschwächt wird. Die persistierenden Infektionen werden ihrerseits eingeteilt in latente, tolerierte und okkulte (maskierte) Infektionen. Bei der latenten Infektion, die nach WENDT (1998) bei der Galtmastitis bis zu 30 % der Fälle ausmachen kann, stellt sich ein Gleichgewichtszustand zwischen der Aggression des Erregers und der Abwehr des Wirts ein, bis einer der beiden Beteiligten gegenüber dem anderen einen Vorteil erringt, das heißt eine latente Infektion lässt sich jederzeit aktivieren. Dabei kann sie in eine subklinische Infektion übergehen. Nach MAJERT (1931) verlaufen die meisten durch *S. agalactiae* hervorgerufenen Mastitiden chronisch schleichend, wobei das vorangehende akute Stadium zumeist übersehen wird, da es nur von kurzer Dauer ist. Das chronische Stadium verläuft häufig ebenfalls ohne klinische Entzündungssymptome. Lediglich die Milchleistung ist reduziert und der Gehalt an somatischen Zellen erhöht; zumeist sind die Mastitiserreger durch eine bakteriologische Untersuchung nachweisbar. SCHULZ (1994) sprach von einer Reduktion der Milchleistung der betroffenen Viertel bei einer Galtmastitis um bis zu 30 %. WENDT (1998) stellte sogar Milchverluste von 35 % fest. Allerdings wurde diese Minderleistung wenigstens vorübergehend von den nichtinfizierten Vierteln kompensiert.

Bei der eher seltenen klinischen Form der Galtmastitis treten die klassischen, äußerlich erkennbaren entzündlichen Veränderungen am Euter auf, wie Schwellung, Rötung, Schmerzhaftigkeit, vermehrte Wärme und eingeschränkte bis versiegende Milchleistung. MAJERT (1931) stellte bei der Palpation eines klinisch auffälligen, chronisch galtinfizierten Euters umgrenzte knotige, strangförmige oder ausgedehnte Verhärtungen des Gewebes fest. Die Zitzen des betroffenen Viertels fühlten sich derb an, und die Milch ließ sich nur schwer ermelken. Im weiteren erwähnte der Autor, dass

zunächst nur ein Viertel betroffen sein könne, in der Folgezeit erkrankten dann aber zumeist auch die anderen. Das ermolkene Sekret weise sinnfällige Veränderungen auf. Es könne von wässriger, blutiger, jauchiger, seröser, eitrig oder auch breiiger Beschaffenheit sein, so dass der Milchcharakter nicht mehr erhalten sei. STADTFELD (1979) berichtete, dass sich die klinische Form des „Gelben Galt“ in einer katarrhalisch-eitrigen Entzündung der Milchgänge und Alveolen mit gelber Verfärbung der Milch äußere. OLTENACU und EKESBO (1994) stellten bei 15 % der Erstkalbinnen der Rasse Schwedisch-Frisian eine klinische *S. agalactiae*-Mastitis fest. WENDT (1998) ging von maximal 5 % durch *S. agalactiae* ausgelöster klinischer Mastitiden aus. SARGEANT et al. (1998) konnten in Ontario *S. agalactiae* nur aus 0,7 % der von Kühen mit klinischer Mastitis gewonnenen Milchproben isolieren. NASH et al. (2000) fanden heraus, dass weniger als 1 % der von ihnen untersuchten Kühe eine durch *S. agalactiae* verursachte klinische Mastitis entwickelten.

#### 2.2.1.4 Pathologisch-anatomische Veränderungen

Nach ROLLE und MAYR (1993) zeigt *S. agalactiae* eine selektive Adhärenz gegenüber den Epithelien des Strichkanals, der Milchzisterne und der großen Milchgänge, wo sich der Erreger anlagert und vermehrt. Ein einmal infiziertes und nicht behandeltes Euter kann die Galtstreptokokken über mehrere Laktationsperioden beherbergen und stellt eine ständige Infektionsquelle für alle Tiere des Bestandes dar. Untersuchungen von EDMONDSON (1989) sowie FOX und GAY (1993) zufolge dringt *S. agalactiae* nicht in das Drüsengewebe ein, sondern heftet sich an die Epithelzellen, wo es durch die Milchsäureproduktion der B-Streptokokken zu Gewebszerstörungen kommt, die permanent sein können. Die typische Form der *S. agalactiae*-Mastitis ist nach HOFFMANN (1991), SELBITZ (1992) sowie SCHULZ (1994) die chronisch-katarrhalische Mastitis (*Galactophoritis et Mastitis catarrhalis chronica et interstitialis fibrosa*), die typischerweise intermittierend subakute und akute Stadien aufweist. In deren Verlauf kommt es zu einer auffälligen Proliferation des interalveolären und interlobulären Gewebes durch Einwanderung von Lymphozyten, Makrophagen, Fibroblasten, Fibrozyten und zur Ausbildung kollagener Fasern, in deren



Folge die Alveolen auseinandergedrängt und komprimiert werden. Dadurch werden die Drüsenendstücke verkleinert und zahlenmäßig reduziert. Dies führt im weiteren zu einer Atrophie der Drüsenläppchen. In ihrem Innern sammeln sich Exsudatzellen und Flüssigkeit an. Die Milchgänge werden ebenfalls komprimiert und reagieren hyperplastisch in Form papillenartiger Vorsprünge, die das Lumen weiter einengen. Es kommt zu Sekret- und Exsudatstauungen in den Alveolen und den Milchgängen (SCHULZ, 1994). Der pathologische Befund äußert sich in derben Bezirken innerhalb des Eutergewebes, die sich schlecht durchschneiden lassen. Häufig ist das Drüsenparenchym vollständig in ein derbes, grauweißes Fasergewebe ohne Läppchenstruktur umgewandelt, was als bindegewebige Induration bezeichnet wird. Die Zisternen und die großen Milchgänge sind mit schleimigem Inhalt gefüllt. Das Epithel ist nach SCHULZ (1994) verdickt und weist polypöse Veränderungen auf.

#### **2.2.1.5 Diagnose**

Nach WENDT (1998) ist die erste Maßnahme bei der Diagnosestellung einer Galtmastitis die klinische Untersuchung, die mit der Adspektion des Euters beginnt. Nur bei der klinischen Form des „Gelben Galts“ sind beispielsweise Asymmetrien der Viertel zu erkennen. Die unpigmentierte Euterhaut kann Rötungen aufweisen. Bei der nachfolgenden Palpation sind sowohl im klinischen als auch im subklinisch-chronischen Fall Veränderungen des Drüsengewebes festzustellen. Diese äußern sich durch derbe, knotige Verhärtungen im Drüsengewebe und in Atrophie der betroffenen Viertel. Zur ätiologischen Diagnosestellung werden Milchproben nach den Leitlinien der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e. V., Arbeitskreis Eutergesundheit (Stand: 12 / 98) entnommen. Bei Einhaltung einer Kühlung (4 – 5 °C) ist ein maximales Intervall von 24 h zwischen Probenahme und Untersuchung anzustreben, ansonsten müssen die Proben konserviert werden. Mit Konservierungsmitteln versetzte Proben können 72 h bei ca. 6 °C bis zur Untersuchung gelagert werden. In den Laboratorien wird zunächst der Gehalt an somatischen Zellen bestimmt. Es folgt der kulturelle Nachweis der Galtstreptokokken durch Ausstreichen

der Milch auf entsprechenden Nährmedien, vorzugsweise Blutagarplatten. Diesem Diagnoseschritt kann sich eine Keimzahlbestimmung anschließen.

#### **2.2.1.6 Therapie und Herdensanierung**

NOCARD und MOLLEREAU (1887) führten Instillationsversuche mit einer 4 %-igen Borsäurelösung in die betroffenen Euterviertel durch. In den Jahren vor der Entdeckung und therapeutischen Anwendung des Penicillins schlugen nach MAJERT (1931) viele Therapieversuche mit Roborantien und Eutersalben fehl. Der Autor berichtete, dass nach dem I. Weltkrieg die Akridinabkömmlinge Rivanol, Uberasan und Parenchymatol zur Galtbehandlung herangezogen wurden. BUGGE (1924) und SCHNORF (1925) erzielten wechselnde Erfolge bei der intramammären Instillation von Rivanollösungen (1 : 1000) in Kombination mit einer 0,5 %-igen Kochsalzlösung, wobei allerdings ein starker Rückgang der Milchleistung beobachtet wurde. Auch GÖTZE (1931) und SEELEMANN (1932b) verwendeten die Akridinfarbstoffe Rivanol und Entozon in Form von Euterspülungen zur Galtbekämpfung. SCHNORF (1925) schilderte, dass die guten Erfolge mit der intravenösen Injektion von Brillantphosphin jedoch durch erhebliche Abfälle der Milchleistung zunichte gemacht wurden. SCHÖCHLI (1926), der Verfechter der sogenannten Ausmelktherapie, berichtete, dass durch häufiges Ausmelken des erkrankten Euters in 83 % der untersuchten Fälle eine Heilung erzielt werden konnte, was er mit der durch eine Massage verbesserte Durchblutung und mit einer vermehrten Beseitigung der Erreger und der infizierten Milch in Zusammenhang brachte. SÜPFLE und HOFMANN (1927) führten eine gezielte Behandlung mit einer stallspezifischen Vakzine durch, die sie den erkrankten Tieren dreimal im Abstand von acht bis zehn Tagen subkutan injizierten, wodurch sie „sehr ermutigende Ergebnisse“ erzielten. Behandlungen mit Vakzinen aus abgetöteten Streptokokken und Staphylokokken führten nach MAJERT (1931) nicht zu bleibenden Erfolgen, da es nach dem Überstehen einer Galtinfektion nicht zu einer lokalen oder gar allgemeinen Immunität kam. WAGNER (1934) berichtete ebenfalls von umfangreichen Versuchen zur

Immunotherapie mit Vakzinen, die aber wenig Erfolge zeigten. Auch die unspezifische Reiztherapie beispielsweise durch parenterale Eingabe von kontaminierter Milch oder durch Verabreichung sogenannter Schwellenreizmittel wie Yatren-Casein, Introzid, E 104, Terpentinöl oder Omnadin konnte sich laut WAGNER (1934) bei der Bekämpfung des „Gelben Galts“ nicht durchsetzen. Vorzugsweise angewendet wurden physikalische Behandlungsmethoden, wie Kaltwassertherapie, Massagen mit und ohne Eutersalben, feuchtwarme Packungen oder heiße Duschen, wobei viele dieser Verfahren mit der sogenannten Ausmelktherapie kombiniert wurden. Dabei erfolgte das intensive Ausmelken etwa alle zwei Stunden. Schließlich wurde der Chemotherapie unter anderem mit Silber- und Jodpräparaten, Kreolin und Selektan sowie Borsäure, Karbolsäure, Formalin oder Glycerinalkohol große Aufmerksamkeit gewidmet (WAGNER, 1934). SEELEMANN (1932c) betonte die Wichtigkeit hygienisch-prophylaktischer Maßnahmen. Zu diesen zählte er sachgemäßes Melken, gute Euterpflege, gründliches Ausmelken und Sauberkeit im Stall. Außerdem forderte er die Separierung infizierter Tiere.

Obwohl das Antibiotikum Penicillin bereits im Jahre 1928 durch Fleming entdeckt wurde, konnte es erst ab dem Jahre 1943 in solchen Mengen gewonnen werden, die seinen Einsatz in der Therapie von B-Streptokokkeninfektionen des Menschen möglich machten (GROSSENBACHER, 1951). Der Autor berichtete ausführlich über die Galtbekämpfung in Deutschland, indem er ein Flugblatt der Forschungsanstalt für Milchwissenschaften in Kiel aus dem Jahre 1949 mit detaillierten Instruktionen für das Melken zitierte. In diesem erfolgte erstmals die Empfehlung des Gebrauchs von „keimtötenden Melkfetten“. Weiterhin wurde den Melkern nahegelegt, sich die Hände nach dem Melken mit desinfizierenden Lösungen, so z. B. mit Sagrotan oder Chloramin, zu waschen. Desinfektionsmaßnahmen für Gerätschaften und Stallgebäude wurden allerdings nicht gefordert.

In der Schweiz führten die Käsereigenossenschaften und Milchverbände vierteljährlich Euterkontrollen durch, zu denen eine klinische Untersuchung des Euters, Prüfung der Milch und bei sinnfälligen Veränderungen eine bakteriologische Untersuchung von aseptisch entnommenen Milchproben gehörten. Bei Feststellung von Galtstreptokokken wurden nach KÄSTLI (1949) folgende Maßnahmen eingeleitet:

1. Untersuchung des Gesamtbestandes zur Feststellung aller infizierten Viertel.
2. Trennung der infizierten Tiere von den nicht infizierten, Reinigung und Desinfektion des Stalles und sämtlicher Gerätschaften. Separates Melken der infizierten Tiere, möglichst durch einen besonderen Melker.
3. Gleichzeitige Behandlung aller klinisch erkrankten und latent infizierten Tiere durch intramammäre Instillation von 20.000 bis 50.000 Einheiten Penicillin pro Viertel dreimal im Abstand von 24 h.
4. Bakteriologische Nachuntersuchung der behandelten Tiere ein bis zwei Wochen nach der Behandlung. Erneute Behandlung der nicht galstreptokokkenfreien Viertel bzw. Trockenstellen oder Schlachtung der betreffenden Kuh.
5. Bakteriologische Untersuchung aller Kühe des Bestandes vier Monate nach der letzten Behandlung. Bei negativem Befund Durchführung der nächsten Kontrolluntersuchung nach einem Jahr.
6. Absonderung und separates Melken zugekaufter Tiere bis zur Vorlage des negativen bakteriologischen Befundes der Milchuntersuchung.

Die USA setzten nach GROSSENBACHER (1951) bei den Bekämpfungsmaßnahmen zum Teil andere Schwerpunkte. Dort wurde erheblich mehr Wert auf die Reinigung und Desinfektion aller mit den infizierten Tieren in Berührung kommenden Gerätschaften und Stallflächen gelegt. Außerdem sollte das gegenseitige Besaugen durch Kälber und Rinder und die Kontaktaufnahme zwischen Erstlingskühen und älteren Kühen verhindert werden. Für das Waschen der Euter wurden separate Tücher und jeweils frisches Wasser mit Hypochloritzusatz verwendet. Es kam jeweils ein frisch desinfizierter Melkbecher zum Einsatz. Milch durfte nicht auf den Boden gemolken werden. Das Ausmelken per Hand war zu unterlassen. Dem Dippfen der Zitzen in eine Desinfektionslösung nach dem Melken, der Desinfektion der Melkbecher und dem Waschen der Hände nach dem Melken jeder Kuh wurden besondere Bedeutung beigemessen. GROSSENBACHER (1951) kam zu dem Schluss, dass hygienische Maßnahmen allein nicht zu einer Tilgung des „Gelben Galts“ in einem Bestand ausreichen. Allerdings seien sie sehr gut geeignet, um weitere Ausbreitung im Bestand zu verhindern. OBIGER (1957) sowie DEDIÉ und KIELWEIN (1962) betrachteten die

Verbesserung der Melkhygiene und -technik als den entscheidenden Schritt bei der Sanierung eines Galtbestandes.

Da der Erreger für längere Zeit nur im Milchdrüsengewebe überleben konnte und für eine Penicillin-Therapie zugänglich war, war eine Eliminierung des Erreger innerhalb einer geschlossenen Rinderherde möglich (McDONALD, 1977). Der Autor berichtete über die Einführung der sogenannten „Blitz-Therapie“ zur Eradikation der Galtstreptokokken in den 60er Jahren des 20. Jahrhunderts. Dabei handelte es sich um die Behandlung der gesamten betroffenen Herde mit einem entsprechenden Antibiotikum. WEAVER et al. (1986) empfahlen die intramammäre Instillation von 100.000 Internationalen Einheiten (I.E.) Procain-Penicillin G in Kombination mit 150 mg Novobiocin zweimal im Abstand von 24 h. Dadurch erzielten die Autoren Heilungsraten zwischen 88 - 92 %. ERSKINE und EBERHART (1990) reduzierten mittels derselben Methode die Herdenprävalenz innerhalb von 30 Tagen von 41,6 auf 9,3 % und innerhalb eines Jahres auf 4,2 %. Die Autoren errechneten ein Nutzen/Kosten-Verhältnis. Dieses betrug für die Behandlung der gesamten Herde 1,26 : 1,0, für die Behandlung aller Kühe mit einem Gehalt von  $\geq 140.000$  somatischen Zellen/ml im Viertelgemelk 2,18 : 1,0 und für die Methode der mikrobiologischen Untersuchung der Viertelgemelksproben aller Kühe in Verbindung mit der Behandlung der nachgewiesenermaßen infizierten Kühe sogar 2,28 : 1,0. YAMAGATA et al. (1987) untersuchten ebenfalls den Nutzen einer Laktationsbehandlung im Verhältnis zu den aufzuwendenden Kosten. Der errechnete Nettogewinn setzte sich wie folgt zusammen:

$$\text{Nettogewinn} = \text{Erlös aus der Milchertragszunahme} + \text{Einkünfte aus der Abgabe therapieresistenter Kühe} - \text{Behandlungskosten} - \text{Wiederanschaffungskosten für Kühe zur Aufstockung des Milchviehbestandes.}$$

Die Steigerung der Milchleistung nach erfolgreicher Therapie war laut YAMAGATA et al. (1987) so signifikant, dass mit dem Erlös zumindest in den ersten beiden Laktationsdritteln die Behandlungskosten und die Kosten für weitere Sanierungsmaßnahmen problemlos aufgefangen und darüber hinaus Gewinne erzielt werden konnten. Nur bei der Behandlung im letzten Laktationsdrittel kam es eher zu Verlusten, da die physiologischerweise abnehmende Milchleistung in diesem Laktationsstadium die anfallenden Kosten nicht mehr kompensieren konnte. Eine Alternative biete sich durch die Merzung dieser Tiere, wobei allerdings Überlegungen darüber anzustellen seien, ob es sich um ansonsten wertvolle

Hochleistungskühe handele. EDMONDSON (1989) schlug eine Behandlung mit 300 mg Erythromycin pro infiziertem Viertel nach zwei aufeinanderfolgenden Melkzeiten vor. Für das Trockenstellen nutzte der Autor 500 mg Cloxacillin in Kombination mit 250 mg Ampicillin. Der Nettogewinn betrug bereits in den ersten 12 Monaten nach der initialen „Blitz“-Therapie 41 % der investierten Kosten allein aus der gesteigerten Milchleistung und verbesserten Milchqualität. ROLLE und MAYR (1993) empfahlen zur Bekämpfung der Galtmastitis zwei intramammäre Injektionen von je 100.000 I.E. Penicillin G im Abstand von 48 Stunden. Wichtig seien weiterhin hygienische und prophylaktische Maßnahmen zur Sanierung des Bestandes, z. B. das Dippen der Zitzen in entsprechende Desinfektionslösungen nach dem Melken. Für die Behandlung empfahl SCHULZ (1994) zunächst das sofortige und gründliche Ausmelken zur Entfernung der Mastitiserreger, der Bakterientoxine und Entzündungsprodukte, eventuell unterstützt von physikalischen Behandlungsmaßnahmen, wie Heißwassertuschen, heiße Breiumschläge oder Kampfersalben zur Hyperämisierung. In erster Linie ist jedoch die Chemotherapie bei einer *S. agalactiae*-Mastitis von Bedeutung. Bei der Behandlung mit dem bakterizid wirkenden Penicillin G durch intramammäre Applikation macht man sich die hohe Empfindlichkeit von *S. agalactiae* gegenüber diesem Antibiotikum, die nach Angaben von HEJLICEK (1994) 95,6 - 100 % betrug, zunutze. Der Autor empfahl für die Therapie des trockenstehenden Euters ein depotwirksames Cloxacillin-Benzathinsalz. Zur Verstärkung der Wirkung auch gegen gramnegative Mikroorganismen werden häufig auch Penicillin-Streptomycin- oder Penicillin-Novobiocin-Kombinationen verwendet. Bei der intramammären Applikation sind laut HEJLICEK (1994) wenigstens 500.000 I.E. Penicillin G pro Behandlung zu verabreichen. Eine parenterale Applikation ist bei einer akut-katarrhalischen Mastitis sinnvoll, obwohl sehr hohe Dosen von mehr als 5 Mio. I.E. Penicillin gegeben werden müssen. Der Autor berichtete ebenfalls über die „Blitz-Therapie“ durch intramammäre Verabreichung von 300 mg Erythromycin bei allen Kühen in zwei aufeinanderfolgenden Melkzeiten. Am Ende der Laktation sollte sich eine Erythromycin-Therapie ebenfalls bei allen Kühen des Bestandes anschließen. KLEINSCHROTH et al. (1994) versuchten eine Behandlung aller infizierten Kühe eines Bestandes mit 3 Mio. I.E. Penicillin G pro Viertel zweimal im Abstand von 24 h. Die erste Nachuntersuchung solle zwei Wochen nach der Behandlung erfolgen. Werden

zu diesem Zeitpunkt wieder Galtstreptokokken im Bestand isoliert, ist eine erneute Behandlung durchzuführen, bis keine Galtinfektionen mehr festzustellen sind. Sechs bis acht Wochen nach der erfolgreichen Eradikation werden alle Tiere erneut beprobt. Eine weitere Kontrolluntersuchung sollte nach drei bis vier Monaten stattfinden. Im sanierten Bestand wären dann Überwachungsuntersuchungen in halbjährlichen bis jährlichen Abständen erforderlich. Tiere, die sich als therapieresistent erweisen, sind aus dem Bestand zu entfernen. Die Wiedereinschleppung, beispielsweise durch zugekaufte Tiere, muss vor deren Einstallung durch bakteriologische Untersuchungen zweimal im Abstand von einigen Tagen vermieden werden (KLEINSCHROTH et al., 1994). ERSKINE et al. (1996) erzielten mit der Therapiemethode von WEAVER et al. (1986) eine Heilungsrate von 91,7 % nach vier Wochen bzw. von 96,8 % nach acht Wochen. BOYER (1997) berichtete allerdings von einem Ausbruch einer klinischen Mastitis bei 21 Milchkühen eines Bestandes unmittelbar nach einer solchen „Blitz-Therapie“. WOLTER et al. (1999) empfahlen bei einem Anteil von mehr als 30 % galtinfizierter Viertel in einem Bestand die „totale Blitz-Therapie“, bei der alle Kühe des Bestandes schlagartig zu behandeln seien. Sollte der Anteil der infizierten Viertel niedriger sein, käme die „partielle Blitz-Therapie“ zur Anwendung, bei der alle galtinfizierten Kühe und Kühe mit einem erhöhten Zellgehalt schlagartig behandelt würden. Für die Galtbekämpfung solle eine dreimalige intramammäre Applikation von 3 Mio. I.E. Penicillin G im Abstand von 24 h durchgeführt werden, wobei stets alle Viertel eines infizierten Tieres zu behandeln seien. Alternativ wurde auch eine Kombination aus dieser intramammären Therapie und einer dreimaligen parenteralen Behandlung mit Penethamathydrojodid-Penicillin i. m. im Abstand von 24 h vorgeschlagen (Dosierung: 10 Mio./ 5 Mio./ 5 Mio. I.E.). Eine erste bakteriologische Nachuntersuchung der Milch aller Tiere, auch der nichtbehandelten, solle ca. sechs Wochen nach dem Ende dieser Behandlung erfolgen. Weitere Nachuntersuchungen seien nach drei, sechs und zwölf Monaten durchzuführen. Als Therapie beim Trockenstellen empfahlen WOLTER, KLOPPERT und ZSCHÖCK (persönliche Mitteilung) entweder die Applikation von 1 Mio. I.E. Penicillin G in Kombination mit 500 mg Neomycin in einer speziellen Langzeitformulierung oder 1 Mio. I.E. Penicillin G in Kombination mit 500 mg eines penicillinastabilen Penicillins. Der Sanierungserfolg war nach WOLTER et al. (1999) stark abhängig von der Melkhygiene und der konsequent durchgeführten Therapie.

Nach Untersuchungen der Autoren betrug die Sanierungsrate in solchen Betrieben ca. 98 %, während sie in Betrieben mit ebenfalls guter Melkhygiene aber inkonsequenter Therapie auf 88 % und in Betrieben, in denen zudem noch die Melkhygiene schlecht war, nur noch 85 % betrug. Außerdem waren zur Erzielung dieser Erfolge für die erstgenannten Betriebe lediglich 97 Tage erforderlich, für die letztgenannten Betriebe jedoch 437 Tage.

Nach KEEFE (1997) kam es aufgrund der guten Therapierbarkeit zu einer drastischen Verringerung der Prävalenz innerhalb der Milchviehbestände in den 90er Jahren des 20. Jahrhunderts. Da Mastitiden aber immer ein Herdenproblem darstellen, kann die Therapie betroffener Tiere, wenn sich ein dauerhafter Erfolg einstellen soll, nur ein Bestandteil eines Herdensanierungsprogrammes sein. WOLTER et al. (1999) schätzten das Infektionsrisiko für nicht infizierte Viertel um so höher ein, je größer die Anzahl der galtninfizierten Viertel in einer Herde sei. Verbleibe auch nur ein Anteil von mehr 2 % infizierter Viertel durch inkonsequente Therapie in der Herde, könne selbst durch gute Melkhygiene eine Ausbreitung von *S. agalactiae* nicht verhindert werden.

TIEFENTHALER (1995) berichtete über gute Erfolge bei der Behandlung der chronisch-katarrhalischen Mastitis mit homöopathischen Mitteln. So verwendete der Autor z. B. Magnesium fluoricum in den Potenzen D12, D30 oder D200 zur Steigerung der Infektabwehr und zur Entgiftung von Erregertoxinen durch Eingreifen in deren Enzymhaushalt. Magnesium fluoricum soll zudem eine spezifische Wirkung gegen Streptokokken und Staphylokokken entfalten. Im weiteren empfahl der Autor Conium maculatum D4 zur Behandlung von gut abgrenzbaren Euterknötchen. Zur Kombination mit diesen Mitteln eignete sich Echinacea compositum in den Potenzen D2 oder D8, das allgemein abwehrsteigernd wirke. Vorteile der homöopathischen Behandlung liegen im Wegfallen aller negativen Nebenwirkungen, wie Wartezeit, Resistenz- oder Allergieprobleme.

Seit den 80er Jahren des 20. Jahrhunderts wandte die Wissenschaft sich erneut der Erforschung einer möglichen Vakzinationstherapie zu. COLDITZ und WATSON (1985) erforschten intensiv die immunophysiologischen Grundlagen für eine Vakzination von Wiederkäuern gegen Mastitis. YANCEY (1993) und HEJLICEK (1994) berichteten von Versuchen, eine aktive Immunisierung gegen *S. agalactiae* beim Rind einzuführen. Es wurden in der Vergangenheit drei Wege erprobt. Zum ersten sollte



eine parenterale Immunisierung in verschiedenen Körperregionen durchgeführt werden. Das nicht zu überwindende Problem hierbei war nach HEJLICEK (1994) die Unpassierbarkeit der Epithelien der gesunden Milchdrüse für Antikörper aus dem Blutserum. Eine zweite Methode bestand in der Immunisierung im Bereich der supramammären Lymphknoten, womit ein etwas größerer Erfolg erzielt werden konnte. Am wirksamsten erwies sich die lokale Immunisierung durch Applikation der Vakzine über den Zitzenkanal direkt in die Milchdrüse. Allerdings konnte nur in der Trockenstehphase ein zeitweiliger Anstieg des IgA-Gehaltes induziert werden. ZECONI und SMITH (2000) beschrieben Feldversuche zur Immunisierung von Milchkühen mit einer Vakzine aus abgetöteten *S. agalactiae* in einer Formalin Formulierung, mit welcher kein Effekt auf die Inzidenz von Infektionen erzielt werden konnte. Es wurde im weiteren versucht, antigene Strukturen, wie Proteinantigene bzw. das Gruppenpolysaccharidantigen, in einer Vakzine zu verwenden. Beide waren in der Lage, eine Immunantwort hervorzurufen, die jedoch nur von kurzer Dauer war. Bislang ist es noch nicht gelungen, mit einer Vakzinetherapie einen Milchviehbestand auf Dauer gegen eine Infektion mit dem Galterreger zu schützen (YANCEY, 1999).

#### **2.2.1.7 Prognose**

Spontanheilungen kommen nach GROMMERS et al. (1985) bei *S. agalactiae*-Mastitiden wesentlich seltener vor als bei Euterentzündungen, die durch *S. dysgalactiae*, *S. uberis* und sogar *S. aureus* hervorgerufen werden. In einer nichtlaktierenden, involutionierten Milchdrüse kann es zur Regeneration des geschädigten Drüsenparenchyms kommen, während die Wiederherstellung des Gewebes in der Laktation fraglich ist (YAMAGATA et al., 1987). Unbehandelte subklinische Galtmastitiden bleiben in der Regel bestehen oder können sich sogar zu klinisch apparenten Verlaufsformen entwickeln. Eine vollständige Regeneration ist laut SCHULZ (1994) nur in jenen Drüsenläppchen möglich, in denen sich die Entzündung noch im Stadium der Exsudation befindet und es noch nicht oder bisher in sehr

geringem Umfang zu einer Proliferation des interalveolären und interlobulären Gewebes gekommen ist. Bei der Galtmastitis, deren chronischer Verlauf immer wieder von akuten Schüben unterbrochen wird, ist die Prognose für eine vollständige funktionelle Wiederherstellung (*Prognosis quoad functionem bona*) des erkrankten Viertels infaust.

### 2.2.1.8 Prophylaxe

SEELEMANN (1932c) sowie KLIMMER und HAUPT (1933) bewiesen in ihren Untersuchungen die große Bedeutung des Melkaktes bei der Übertragung der Galtstreptokokken. Der Prophylaxe dienten laut WAGNER (1934) die getrennte Aufstallung von gesunden, kranken bzw. verdächtigen Kühen, Maßnahmen zur Reinigung und Desinfektion der Melkgerätschaften und angemessene Stallhygiene. GÖTZE (1950) berichtete, dass das bloße Waschen des Euters mit Wasser nur den groben Schmutz entfernt, nicht aber zu einer Keimreduktion beiträgt. Durch diese Maßnahme könne die Übertragung des Mastitisserregers von Kuh zu Kuh geradezu begünstigt werden. BÖRGER (1951) stellte fest, dass das Waschen und Desinfizieren des Euters mit Tego 51 eine Keimabnahme in der Milch und eine gute Desinfektionswirkung auf der Haut bewirkte. NITSCH (1948), GÖTZE (1950), KRÜGER (1958a, 1958b) sowie MERKT (1962) brachten die Zucht von mastitisresistenten Tieren ins Gespräch. So stellten HOWELL et al. (1954) bei ihren Versuchen zur experimentellen Induktion einer Galtmastitis fest, dass sich rund 50 % der künstlich mit *S. agalactiae* infizierten Kühe als resistent erwiesen und keine Mastitis entwickelten. NICKERSON et al. (1986) gelang durch das Dippen mit einem 0,5 %-igen Jodophorpräparat die Reduktion der Inzidenz für eine intramammäre Infektion mit *S. agalactiae* in einer Milchviehherde um ca. 46 %. In den USA wurde durch das „National Mastitis Council“ 1987 ein Mastitis-Kontroll-Programm eingeführt, durch welches die Herdenprävalenz in einigen Regionen des Landes auf unter 15 % gesenkt werden konnte (SISCHO et al., 1993). Von besonderer Bedeutung waren nach FOX und GAY (1993) neben der Verwendung von zitzenpflegenden Präparaten zum Dippen, die Verwendung von Einmaltüchern zur Säuberung des Euters und der Zitzen und die

Zwischendesinfektion der Melkzeuge. KLEINSCHROTH et al. (1994) schlugen vor, alle Kühe etwa zwei Wochen vor dem Trockenstellen klinisch und zytologisch zu untersuchen. Werden dabei Anzeichen einer Galtmastitis festgestellt, müsse sich eine bakteriologische Untersuchung der Viertelgemelke anschließen. Der Befund erlaube dann eine gezielte tierärztliche Behandlung. Bei der Galtprophylaxe ist nach ROTTSCHIEDT und WINKELMANN (1991) sowie nach WENDT (1998) bei der Bestandsergänzung in erster Linie darauf zu achten, dass Tiere nur aus *S. agalactiae*-freien Beständen zugekauft werden. Ob es sich um einen seuchenhygienisch sicheren Zukauf handelt, läßt sich durch wiederholte mikrobiologische Milchuntersuchungen feststellen, die jeweils ein negatives Ergebnis aufweisen sollten. Im weiteren ist auf die Melkhygiene und Melktechnik zu achten. Dies beinhaltet tägliche Eutergesundheitskontrollen durch die Melker, die regelmäßige Milchuntersuchung aller Kühe auf Zellgehalt und Erregervorkommen und die konsequente Diagnostik bei allen euterkranken Tieren. Ein sanierter Bestand gilt laut WENDT (1998) dann als galtfrei, wenn drei aufeinanderfolgende bakteriologische Milchuntersuchungen im monatlichen Abstand jeweils negativ ausfallen, wenn gleichzeitig klinische Verdachtsfälle auszuschließen sind und die Zellzahluntersuchung bei mehr als 85 % der laktierenden Einzeltiere 200.000 Zellen/ ml nicht übersteigt. Von besonderer Bedeutung für die Mastitisbekämpfung ist nach KRÖMKER (1999) seit mehr als 30 Jahren das vorsorgliche Trockenstellen auch der eutergesunden Kühe unter antibiotischem Schutz, wodurch Eutergesundheitsstörungen bis zum Abkalben weitgehend vermieden werden können. So wurden z. B. im Jahr 1996 52 % aller Milchkühe zum Zeitpunkt des Trockenstellens mit einem antibiotischen Präparat behandelt, im Jahr 1998 sogar 62 % (KRÖMKER, 1999). Die Erfolge dieser Behandlung zeigten sich in Senkung der Neuinfektionsrate durch *S. agalactiae* um bis zu 80 %. Die unbedingte Voraussetzung für das Trockenstellen ist nach LOTTHAMMER (1999) die Eutergesundheit des entsprechenden Tieres. Kühe mit einem Mastitisproblem in der ablaufenden Laktationsperiode sind zuvor einer bakteriologischen Milchuntersuchung zu unterziehen und gegebenenfalls gezielt zu therapieren. Unter den in der „Lila Liste“ für die Anwendung zum Trockenstellen von Kühen zugelassenen Präparate machen laut KRÖMKER (1999) die  $\beta$ -Lactam-Antibiotika (Penicilline, Cephalosporine), vor allem

penicillinasestabile  $\beta$ -Lactam-Antibiotika und Kombinationen aus diesen mit Neomycin 98 % aller verkauften Präparate aus. Flankierende Maßnahmen beim Trockenstellen sind unter anderem entsprechende Hygiene im Stall und Ausgleich von Fütterungsungleichgewichten, das heißt Reduktion der Kraftfuttergaben entsprechend der zurückgehenden Milchleistung am Ende der Laktation.

### 2.2.2 Vorkommen bei anderen Tierarten

GROSSENBACHER (1951) berichtete von Untersuchungen, in denen Streptokokken mit gleichen biologischen Eigenschaften wie die der Galtstreptokokken bei Pferden, Kaninchen und Meerschweinchen nachgewiesen werden konnten. SEELEMANN (1954) bezeichnete das Kuheuter zwar als Hauptfundort für *S. agalactiae*, isolierte Streptokokken der serologischen Gruppe B jedoch auch von Tonsillen gesunder Rinder, Schweine und von Labortieren sowie bei einer Zervizitis und einem Abort einer Stute und bei einer Metritis einer Kuh. GEORGE (1954) konnte B-Streptokokken aus multiplen Abszessen bei einem Elefanten nachweisen. Die Erreger führten in einzelnen Fällen auch bei Schafen zu einer Mastitis (MURRA, 1957). FORNINI (1958), SHIMZU (1958) sowie BRAMMER (1981) fanden Streptokokken der Serogruppe B in Tonsillen von Kälbern. BUTTER und DE MOOR (1967) konnten Streptokokken der serologischen Gruppe B aus Proben von Ferkeln, Kaninchen, Eidechsen und Tauben anzüchten. Bei Erkrankungen von Fischen fanden ROBINSON und MEYER (1966) diesen Erreger, der zudem bei verschiedenen Erkrankungen des Meerschweinchens ursächlich beteiligt war (GUPTA und STARK, 1973). WILSON und SALT (1978) berichteten von B-Streptokokkenfunden bei Schweinen, Pferden, Schafen, Vögeln, im Wasser lebenden Säugetieren und bei Fischen. Streptokokken der serologischen Gruppe B wurden weiterhin aus Untersuchungsproben von Mäusen und Fröschen isoliert (AMBORSKI et al., 1983; ELLIOTT et al., 1990). KUMMENEJE et al. (1985) fanden B-Streptokokken bei einem Hamster. Infektionen mit *S. agalactiae* konnten darüber hinaus bei Nutrias, Affen, Katzen, Hunden und Pferden festgestellt werden (KORNBLATT et al., 1983; DOW et al., 1987; BRÜCKLER et al., 1990;

WIBAWAN et al., 1993a; SMOLA, 1993; DEDIÉ et al., 1993; LÄMMLER und HAHN, 1994; LÄMMLER et al., 1998a, YILDIRIM et al., 2002; YILDIRIM, 2002). B-Streptokokkeninfektionen äußerten sich in einzelnen Fällen bei Schweinen in Form einer Mastitis (HOMMEZ et al., 1991). HEJLICEK (1994) beschrieb Untersuchungen an Schlachtschweinen in der Tschechoslowakei, bei denen *S. agalactiae* in Tonsillen, Gehirn und Mesenteriallymphknoten gefunden wurden. Weiterhin berichtete der Autor vom Nachweis des Erregers bei Sumpfbibern, Hirschen, Damhirschen, Wildschweinen und Füchsen. Bei Kamelen ist *S. agalactiae* ein ebenso bedeutender Mastitiserreger (ABDURAHMAN et al., 1995; YOUNAN et al., 2001) wie beim Rind. B-Streptokokken konnten darüber hinaus bei weiteren Infektionen des Kamels, wie z. B. bei Hautinfektionen, Arthritiden, Atemwegs- und Puerperalinfektionen und Lymphadenitiden isoliert werden (EDELSTEIN und PEGRAM, 1974; YOUNAN et al., 1999; FINK et al., 2000).

### 2.2.3 Erkrankungen beim Menschen

Auf dem Welttierärztekongress in New York im Jahre 1934 erklärte von OSTERTAG, dass Streptokokken der serologischen Gruppe B nur als tierpathogen anzusehen seien, da diese Mikroorganismen bis dahin aus den Tonsillen, der Lunge und dem Urogenitaltrakt von ausschließlich gesunden Menschen isoliert worden waren. Doch schon 1938, so berichtete KIELWEIN (1994), erfolgte die erste Isolierung von B-Streptokokken bei einer Erkrankung eines Neugeborenen. Seit dem Ende der 40er Jahre des 20. Jahrhunderts wurde diesem Keim mehr Bedeutung bei der Infektion von Menschen beigemessen. Aus Säuglingsleichen und aus Rachenabstrichen von Pflegepersonal auf Säuglingsstationen konnte SEELEMANN (1948) B-Streptokokken isolieren. Bei diesen Kulturen handelte es sich ausschließlich um die sogenannten „atypischen Galtstreptokokken“, die der Autor als in kurzen Ketten wachsende B-Streptokokken identifizierte. Die bei Kühen gefundenen Kulturen wuchsen dagegen in langen Ketten. Bis 1970 traten B-Streptokokkeninfektionen beim Menschen nur selten auf, während in den folgenden Jahren ein drastischer Anstieg, vor allem bei

Neugeborenen, festzustellen war (WILKINSON, 1978; BAKER, 1980; BAKER, 1997; SCHUCHAT, 1999; HAHN et al., 1999).

Bei den B-Streptokokkeninfektionen der Neugeborenen wird zwischen einer Früh- und einer Spätform unterschieden (ROSS, 1984; SCHUCHAT, 1998). Für die mit einer Sepsis einhergehende Frühform („early-onset“), die sich innerhalb der ersten sieben Lebensstage entwickelt, gilt der infizierte Geburtsweg der Mutter als Infektionsquelle für das Neugeborene (MATORRAS et al., 1989; HEESCHEN, 1994; BRANDIS et al., 1994; BHUTTA und YUSUF, 1997). Die Übertragung erfolgt also vertikal bei der Geburt. Dies kann bei den betroffenen Säuglingen zu Septikämien und Pneumonien mit perakutem, oft tödlichem Verlauf führen (BRANDIS et al., 1994). Die Autoren berichteten, dass die Mortalitätsrate bei Frühgeborenen bis zu 30 % betrage. VOLLMAN et al. (1976) beobachteten bei 31 Neugeborenen mit einer „early onset“-Erkrankung sogar eine Mortalität von 52 %. Frühgeborene prämatüre Kinder mit klinischen Symptomen des sogenannten „respiratory distress syndrome“, wie Atemnot, Schock und Fieber, waren die gefährdetsten Patienten. Pathologisch-histologisch untersuchtes Organmaterial verstorbener Neugeborener wies typische hyaline Membranen und Pneumonieanzeichen auf. GOODRUM und POULSON-DUNLAP (2002) stellten bei „early onset“-Pneumonien durch B-Streptokokken eine charakteristische Schädigung des Lungenepithels und Endothels fest.

ROUSSET et al. (1979) untersuchten Vaginaltupfer von Frauen auf B-Streptokokken und konnten den Erreger in ca. 17,3 % der Fälle nachweisen. MANIATIS et al. (1996) evaluierten die Signifikanz von B-Streptokokken als ein ätiologisches Agens bei der Vaginitis. Insgesamt wurden 6226 Vaginaltupferproben untersucht; B-Streptokokken konnten in 10,1 % der Fälle nachgewiesen werden. Von den betroffenen Patientinnen zeigten 83 % entzündliche Veränderungen. Laut KIRCHER et al. (1996) wiesen 5 bis 35 % der Schwangeren eine Besiedlung der Vagina und des Rektums mit B-Streptokokken auf. Nach Untersuchungen von CAMPELL et al. (2000) bzw. VOTAVA et al. (2001) waren 20 % bzw. 25 % der Schwangeren zur Zeit der Geburt persistent oder vorübergehend Trägerinnen von B-Streptokokken, wobei bei diesen Frauen Streptokokken der serologischen Gruppe B aus Rektum und Vagina isoliert werden konnten. Bei der Geburt wurden in 40 - 70 % der Fälle B-Streptokokken auf die Neugeborenen übertragen. Von den betroffenen Neugeborenen entwickelten aber nur 1

bis 2 % eine lebensbedrohende Sepsis (LÜTTICKEN et al., 1983; MATORRAS et al., 1989; SPELLERBERG, 2000). Nach BRANDIS et al. (1994) ist die Besiedlung des mütterlichen Genitales nicht der einzige Risikofaktor für das Neugeborene. Hinzukommende Komplikationen bei der Geburt seien z.B. ein vorzeitiger Blasensprung, Fieber bei der Gebärenden, Zervixinsuffizienz oder Frühgeburt und sehr geringes Geburtsgewicht (WESSELS und KASPER, 1993; BRANDIS et al., 1994; HAHN et al., 1999). Ein weiterer wesentlicher Risikofaktor für eine Sepsis bei Neugeborenen durch B-Streptokokken ist laut BRANDIS et al. (1994) das Fehlen von entsprechenden Antikörpern gegen Typenantigene der Erreger. So wurden durch ADDERSON et al. (2000) B-Streptokokken vom Serotyp III als die häufigste Ursache für neonatale Septikämien und Meningitiden identifiziert.

Bei dem sogenannten „late-onset“, der Spätform der neonatalen Infektion mit B-Streptokokken, zu dem es ab dem siebten Lebenstag innerhalb der ersten drei Lebensmonate kommen kann, treten vor allem Meningitiden auf, die bei 15 - 50 % der überlebenden Neugeborenen permanente neurologische Störungen hervorrufen (NIZET et al., 1997; BARTFIELD, 2000). Hierfür machten RENCH und BAKER (1989) die Übertragung durch infiziertes Pflegepersonal oder kontaminierte Muttermilch verantwortlich. BINGEN et al. (1992) dokumentierten verschiedene Fälle der B-Streptokokkenübertragung von Müttern auf deren Kinder mit der Milch, wobei alle Mütter eine Mastitis unmittelbar nach der Entbindung entwickelten. ROLLAND et al. (1999) berichteten über durch B-Streptokokken verursachte Endometritiden und Sterilität bei betroffenen Frauen.

LEWIN und AMSTEY (1981) wiesen bei 722 Schwangeren eine Kolonisierungsrate von 7 - 19 % nach. Bei 51 % der betroffenen Frauen verschwand der Erreger spontan während der Schwangerschaft. Eine Behandlung der Frauen im dritten Trimester und ihrer Ehemänner mit Penicillin G resultierte in einer signifikanten Reduktion der B-Streptokokkenkolonisierung um den Zeitpunkt der Geburt. GREEN et al. (1994) bezifferten die jährliche B-Streptokokkeninfektionsrate bei Neugeborenen in den USA auf ca. 7600 Fälle und beschrieben ebenso wie MOYLETT et al. (2000) sogar einige Fälle einer wiederkehrenden B-Streptokokkeninfektion bei Neugeborenen. McKENNA und IAMS (1998) berichteten, dass annähernd 30 % der Frauen eine asymptomatische vaginale Besiedlung durch B-Streptokokken während der Schwangerschaft aufwiesen.

Trotzdem betrug das Risiko einer Erkrankung unter der Neugeborenen nur etwa 2 ‰ (2 auf 1000 Geburten). ZALEZNIK et al. (2000) erstellten in den USA von 1993 bis 1996 eine Studie über invasive Erkrankungen durch B-Streptokokken bei Neugeborenen, die jünger als sieben Tage waren und bei Schwangeren rund um den Geburtstermin. Bei 157.184 Geburten konnten 130 Erkrankungen bei Neugeborenen (0,8 ‰) und 54 Erkrankungen bei den Frauen (0,3 ‰) festgestellt werden. Es bestanden signifikante Korrelationen zwischen einer neonatalen Erkrankung durch B-Streptokokken und einem Geburtsgewicht von weniger als 2500 g. Bei 28 % der festgestellten B-Streptokokkenkolonisierungen der Mütter führten diese zu einem Abort bzw. zu einer Erkrankung des Neugeborenen. SPELLERBERG (2000) sprach von einer Inzidenzrate bei neonatalen B-Streptokokkeninfektionen von 0,1-0,2 % in den USA und von 0,024-0,126 % in verschiedenen europäischen Ländern. In 80 % der Fälle kommt es bei der Geburt zu einer vertikalen Übertragung von B-Streptokokken bei Schwangeren, deren Geburtskanal kolonisiert ist, auf deren Kinder. Jedoch entwickeln nur 1-2 % dieser Kinder eine invasive Erkrankung. Unter den Betroffenen sind vor allem Frühgeborene (SPELLERBERG, 2000).

Neben den bereits genannten Erkrankungen führen die B-Streptokokken häufig auch bei älteren oder immunsupprimierten Menschen oder bei Personen mit chronischen Erkrankungen, insbesondere bei Diabetikern und Patienten mit neurologischen Ausfallserscheinungen und Zirrhosen, zu schwerwiegenden Infektionen (BRANDIS et al., 1994; KIRCHER et al., 1996; FARLEY, 2001). Wie KIRCHER et al. (1996) weiter berichteten, erfolgte eine Isolierung der Erreger allerdings auch bei gesunden Menschen. So fanden bereits LANCEFIELD und HARE (1935) B-Streptokokken auf der Nasen- und Rachenschleimhaut gesunder Menschen sowie auf der Vaginalschleimhaut bei Frauen während des Puerperiums. ROEMER und GRÜN (1949) wiesen B-Streptokokken als ursächliche Krankheitserreger bei einer tödlich verlaufenden Endokarditis sowie bei einer eitrigen Osteomyelitis beim Menschen nach. Des weiteren isolierte SEELEMANN (1963) B-Streptokokken aus dem Embolus einer Beinarterie, aus Wundabstrichen, dem Liquor eines Säuglings mit Meningitis und aus Rachenabstrichen von Patienten mit Angina. EASMON (1986) fand bei Erwachsenen die asymptomatische Besiedelung der Schleimhäute des Gastrointestinal-, Genital- und Respirationstrakts sowie der äußeren Haut durch Streptokokken der serologischen



Gruppe B. Weiterhin konnten B-Streptokokken bei Pleuritiden, Empyemen, Arthritiden, Otitiden, Konjunktividen, Peritonitiden, Pyelonephritiden, Endometritiden sowie bei Puerperal-, Wund- und Hautinfektionen nachgewiesen werden (SCHWARTZ et al., 1991; FARLEY et al., 1993; BECKER, 1994; BRANDIS et al., 1994; LÄMMLER et al., 1995; GARCIA et al., 1996; LINDBERG, 1998; TISSI et al., 1998; HAHN et al., 1999). HARRISON et al. (1995) untersuchten Patienten in Maryland, die sich mehrmals nacheinander mit B-Streptokokken infiziert hatten. Bei den Erkrankungen handelte es sich u. a. um Endokarditiden und Osteomyelitiden. Die Autoren schlussfolgerten, dass wiederkehrende B-Streptokokkeninfektionen bei Erwachsenen durchaus häufiger vorzukommen scheinen. GARDAM et al. (1998) berichteten von mehreren Fällen einer nekrotisierenden Faszitis und einem Fall eines „Toxic Shock-like“-Syndroms durch Streptokokken der serologischen Gruppe B. Ein „Toxic Shock“-Syndrom, hervorgerufen durch B-Streptokokken, beschrieben auch CHENG und WATANAKUNAKORN (1999). COOPER und MORGANELLI (1998) beobachteten bei durch B-Streptokokken hervorgerufene Bakteriämien bei Erwachsenen eine Letalitätssrate von bis zu 15 %. Die sexuelle Übertragung von Streptokokken der Serogruppe B wurde von YAMAMOTO et al. (1999) beschrieben.

#### **2.2.4 Bedeutung von *S. agalactiae* als Zoonoseerreger**

PLUMMER (1935) isolierte B-Streptokokken aus Halsabstrichen von Kindern, die regelmäßig Rohmilch zu sich genommen hatten. LITTLE (1938) und BROWN (1939) gelang die Übertragung von B-Streptokokken, isoliert aus Tonsillen, Lunge, Urogenitaltrakt, Blut und Peritoneum von Menschen auf Kuheuter, in denen sich daraufhin eine Mastitis entwickelte. Diese Euterentzündung wies dieselben Symptome wie die originäre bovine Galtmastitis auf. Die Erreger zeigten jedoch eine kürzere Verweildauer im Euter. Die Autoren sahen darin den Beweis, dass die Rindermastitis von Menschen auf Kühe übertragbar sei. GROSSENBACHER (1951) berichtete, dass auch beim Menschen Streptokokken der serologischen Gruppe B nachgewiesen wurden, die in ihren Eigenschaften ganz oder teilweise mit *S. agalactiae* übereinstimmten.

HAHN et al. (1972) äußerten die Vermutung, „dass die Erreger über Rohmilch gelegentlich auf den Menschen übertragen werden und sich dann innerhalb der menschlichen Population horizontal und vertikal weiter verbreiten“. VAN DEN HEEVER und ERASMUS (1980) verglichen 100 B-Streptokokkenstämme vom Menschen und 107 Kulturen aus Kuhmilch hinsichtlich ihrer serologischen und biochemischen Charakteristika. Die Autoren schlossen nicht aus, dass ein Teil der Infektionen beim Menschen durch eine Übertragung über die infizierte bovine Milchdrüse und die dadurch kontaminierte Kuhmilch hervorgerufen worden sein könnte. Eine definitive Einteilung der untersuchten südafrikanischen B-Streptokokkenkulturen in humane und bovine Stämme sei aufgrund der Untersuchungsergebnisse nicht möglich gewesen. VAN DEN HEEVER und GIESECKE (1980) sowie JENSEN (1982a) berichteten, dass *S. agalactiae*-Stämme humanen Ursprungs bei Kühen eine schwerwiegende jedoch selbstheilende Mastitis auszulösen vermochten. BRGLEZ (1981) und BRGLEZ et al. (1986) beobachteten eine weite Verbreitung von B-Streptokokken bei Bewohnern von Alpendörfern in Slowenien, die einen engen Kontakt mit infizierten Kühen oder deren Milch hatten. Die Autoren untersuchten Bewohner von 21 Bauernhöfen und die entsprechenden Milchviehbestände und fanden heraus, dass 22 % der Milchkühe mit *S. agalactiae* infiziert waren. Darüber hinaus konnten von 17 Personen aus diesen galtinfizierten Höfen und von fünf Personen aus galtfreien Höfen B-Streptokokken isoliert werden. Die Autoren betrachteten die Übertragbarkeit von Streptokokken der serologischen Gruppe B und somit deren Charakter als Zoonoseerreger als bewiesen, da sie identische bzw. sehr ähnliche Eigenschaften bei den vom Menschen und aus der Kuhmilch isolierten B-Streptokokken nachweisen konnten.

Die „World Health Organization“ (WHO) gab 1981 (zitiert nach DEDIĆ et al., 1993) eine Liste heraus, in der unter den Streptokokken u. a. B-Streptokokken als Zoonoseerreger genannt wurden, wobei die Epidemiologie möglicher Kreuzinfektionen zwischen Tier und Mensch für diesen Keim noch unklar sei. JENSEN (1982a) befürchtete, dass das humane B-Streptokokkenreservoir in Dänemark eine potentielle Gefahr für eine endgültige Sanierung der Milchviehbestände darstellen könnte. Epidemiologische Zusammenhänge glaubte HEESCHEN (1994) dadurch erhärtet, dass

bei Rohmilchkonsumenten häufiger B-Streptokokken nachgewiesen wurden als bei Konsumenten von pasteurisierter Milch.

Im Gegensatz zu diesen Erkenntnissen berichteten FINCH und MARTIN (1984), LÄMMLER und BLOBEL (1987a), DEVRIESE (1991) sowie LÄMMLER et al. (1993a), dass sich die Streptokokken der serologischen Gruppe B von Rind und Mensch anhand kultureller, biochemischer und serologischer Eigenschaften deutlich in zwei Biotypen unterteilen lassen. Aufgrund dieser Unterschiede erscheinen Kreuzinfektionen zwischen Rind und Mensch und umgekehrt eher unwahrscheinlich. WANGER und DUNNY (1985) führten DNA-DNA-Hybridisierungen durch, um die genetische Verwandtschaft von humanen und bovinen *S. agalactiae*-Stämmen zu untersuchen und erkannten, dass B-Streptokokkenstämme humanen Ursprungs einander ähnlicher waren als den Stämmen, die vom Rind isoliert worden waren und umgekehrt. DEVRIESE (1991) schloss sogar aus, dass der Konsum von Rohmilch oder der Kontakt zu infizierten Kühen eine Rolle in der Epidemiologie der B-Streptokokkeninfektionen des Menschen spielen könnte. Der Autor verneinte die Bedeutung von *S. agalactiae* als Zoonoseerreger.

Andererseits erscheinen immer wieder einzelne Berichte über einen möglichen gemeinsamen Ursprung von bovinen und humanen B-Streptokokkenisolaten. So fanden JENSEN und AARESTRUP (1996) identische Ribotypen bei Isolaten aus Kuhmilch und von Melkern. Auch MOSABI et al. (1997) konnten epidemiologische Zusammenhänge zwischen *S. agalactiae* aus Kuhmilch und B-Streptokokken, isoliert von schwangeren Frauen nicht ausschließen. MARTINEZ et al. (2000) isolierten schließlich eine *S. agalactiae*-Kultur aus Kuhmilch, die dieselben Eigenschaften aufwies wie eine von einer asymptomatischen Frau isolierte B-Streptokokkenkultur.

### 3. MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Bakterienkulturen

In der vorliegenden Arbeit wurden 79 *Streptococcus agalactiae*-Kulturen, isoliert von Rindermastitiden, untersucht. Die Isolierung der Kulturen erfolgte zwischen Juli 1996 und März 1997 durch das Staatliche Untersuchungsamt Hessen, Gießen. Dabei wurden Viertelgemelksproben von 54 Kühen aus sieben hessischen Milcherzeugerbetrieben entnommen. In zwei der sieben Betriebe erfolgte acht Monate nach der ersten Probennahme eine erneute Isolierung von *S. agalactiae*. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Herkunft der Bakterienkulturen sowie über die Anzahl der beprobten Kühe bei der Erst- bzw. der Reisolierung. In Abbildung 1, einer Übersichtskarte der Landkreise des Bundeslandes Hessen, sind die sieben beprobten Betriebe eingezeichnet. Die im weiteren verwendeten Kulturen wurden, soweit nicht anders angegeben, der Stammsammlung der Professur für Milchwissenschaften des Instituts für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde der Justus-Liebig-Universität Gießen entnommen. Dazu zählten die 16 *S. agalactiae*-Typenantigenreferenzkulturen 090 (Ia), H36B (Ib), 18 RS 21 (II), 6313 (III), 3139 (IV), SS 1169 (V), NT 6 (VI), 7271 (VII), JM9-130013 (VIII), Compton 24/60 (X), Compton 25/60 (R), BS 30 (Rib), freundlicherweise überlassen von G. Lindahl, Institutionen för Medicinsk Mikrobiologi, Lunds Universitet, Lund, Schweden, GBS 65604 ("R associated antigen"), freundlicherweise zur Verfügung gestellt von L. Bevanger und A. I. Kvam, Avdeling for Mikrobiologi, Regionsykehuset i Trondheim, Trondheim, Norwegen, 335 (cα), 70339 (cβ) und A 909 (Ia/c), ferner die B-Streptokokkenkulturen COH 1, COH 1-11, NCTC 9828, HBS 7, HBS 16, HBS 27, HBS 28, GHBS 265, GHBS 792, FHBS 12, NF 25, 395/2, G 28 und die "*Streptococcus difficile*"-Kulturen ND 2-13 und ND 2-22. In die Untersuchungen wurden im weiteren die B-Streptokokkenkulturen P 5465 (freundlicherweise überlassen von R. Weiß, Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Gießen), 2202/99 und N 3129 (freundlicherweise bereitgestellt von A. Ö. Yildirim, Institut für Tierärztliche

Nahrungsmittelkunde, Professur für Milchwissenschaften, Universität Gießen) sowie Streptokokken anderer Serogruppen bzw. Enterokokken mit einbezogen. Hierbei handelte es sich um die Kulturen *Streptococcus equi* subsp. *equi* CF 32 und *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* W60, *Streptococcus porcinus* K129 (Referenzstamm der Serogruppe E), *Streptococcus suis* S 428/1986, *Streptococcus uberis* NCDO 2022 und *Streptococcus parauberis* NCDO 2020 sowie *Enterococcus faecalis* EK1. Im weiteren wurden eine  $\beta$ -hämolisierende *Staphylococcus aureus*-Kultur (Stamm *Pertsch*) und die *S. aureus*-Kultur Cowan I verwendet.

**Tabelle 1**

**Herkunft der 79 untersuchten *S. agalactiae*-Kulturen**

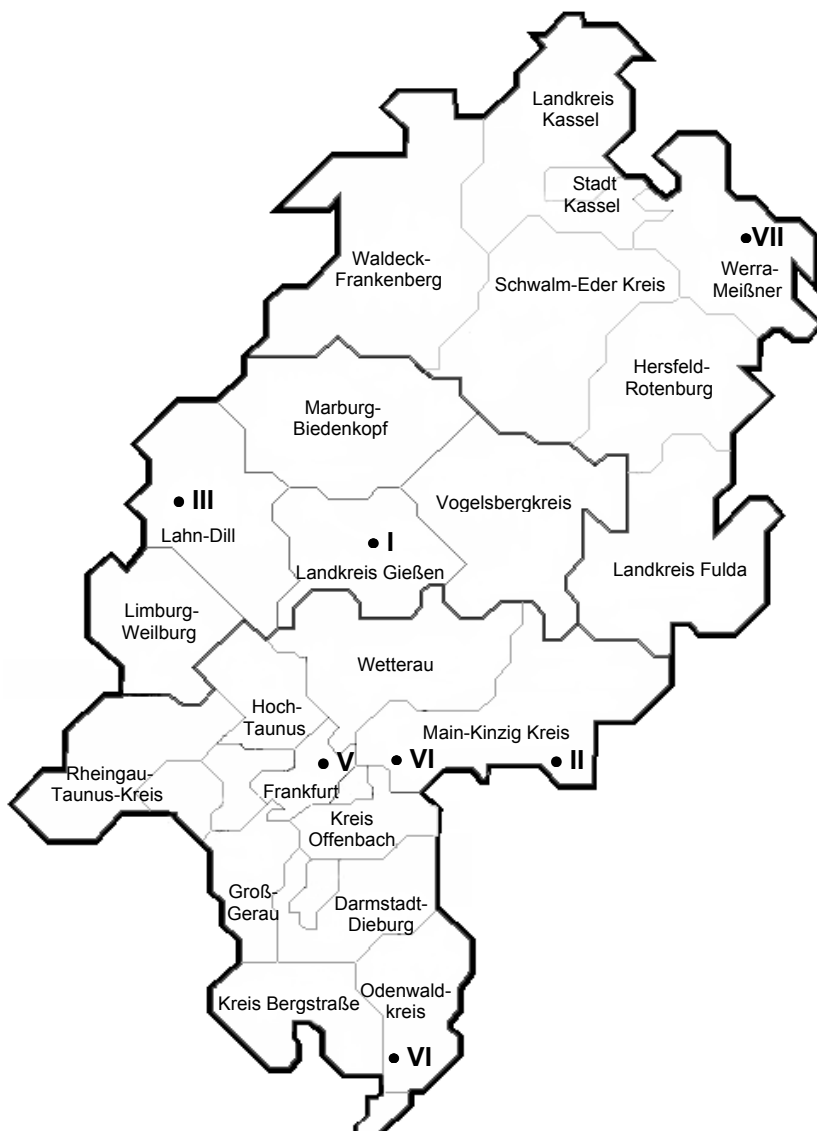
Betrieb	Ortschaften in Hessen	n <sub>1</sub>	n <sub>2</sub>
I	1	6	8
II	2	7	12
III	3	3 / 7*	5 / 14**
IV	4	15 / 6*	17 / 8**
V	5	4	6
VI	6	6	7
VII	7	2	2

n<sub>1</sub> = Anzahl der Kühe mit dem Befund *S. agalactiae*

n<sub>2</sub> = Anzahl der isolierten *S. agalactiae*-Kulturen

\* Anzahl der Kühe bei erneuter Isolierung von *S. agalactiae* nach 8 Monaten

\*\* Anzahl der *S. agalactiae*-Kulturen bei erneuter Isolierung nach 8 Monaten



**Abbildung 1:** Übersichtskarte des Bundeslandes Hessen mit den eingezeichneten Betrieben I-VII.

### 3.2 Anzüchtungsmedien

Die Anzüchtung der *S. agalactiae*-Kulturen erfolgte auf Columbia-Blutagarplatten. Das Nährmedium setzte sich wie folgt zusammen:

#### **Columbia-Agar-Basis (Oxoid, Wesel):**

Pepton	23,0 g
Stärke	1,0 g
NaCl	5,0 g
Agar	10,0 g
Aqua dest.	1000 ml
pH: $7,3 \pm 0,2$	

Das Medium wurde über 15 min bei 121 °C autoklaviert und auf 45 - 50 °C abgekühlt. Anschließend erfolgte der Zusatz von 5 % aseptisch entnommenem, defibriniertem Schafblut bzw. Rinderblut. Je 12 ml des Mediums wurden in sterile Petrischalen gegossen. Die beimpften Platten konnten unter aeroben Bedingungen für 24 – 48 h bei 37 °C bebrütet werden. Für die Beurteilung der CAMP-Reaktion wurden neben den Schaf- auch Rinderblutagarplatten verwendet.

Die Anzüchtung der anderen Streptokokkenkulturen und der beiden verwendeten Staphylokokkenkulturen erfolgte auf Schafblutagarplatten. Dieses Nährmedium setzte sich wie folgt zusammen:

#### **Blutagar-Basis (Merck, Darmstadt):**

Herzextrakt	10,0 g
Tryptose	10,0 g
NaCl	5,0 g
Agar	15,0 g
Aqua dest.	1000 ml
pH: $6,8 \pm 0,2$	

Das nach den Angaben des Herstellers angefertigte Medium wurde autoklaviert (15 min, 121 °C) und auf 45 – 50 °C abgekühlt, bevor die Zugabe von 5 % aseptisch entnommenem, defibriniertem Schafblut erfolgte. Die beimpften Platten konnten unter aeroben Bedingungen für 18 - 24 h bei 37 °C bebrütet werden.

Bei der Kultivierung der Bakterien in flüssigem Medium kam Todd-Hewitt-Bouillon zum Einsatz. Dieses Nährmedium setzte sich wie folgt zusammen:

**Todd-Hewitt-Bouillon (THB; Oxoid):**

Fleischinfusion (aus 450 g fettfreiem Rinderhackfleisch)	10,0 g
Caseinpepton	20,0 g
Glucose	2,0 g
Natriumbicarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ )	2,0 g
NaCl	2,0 g
Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ )	0,4 g
Aqua dest.	1000 ml
pH: 7,8 ± 0,2	

Die Bouillon wurde nach den Angaben des Herstellers angefertigt, zu je 40 ml in 250 ml-Erlenmeyerkolben bzw. zu je 10 ml in Reagenzgläser abgefüllt und für 15 min bei 121 °C autoklaviert. Die Bebrütung der beimpften Kolben bzw. Reagenzgläser erfolgte unter aeroben Bedingungen für 18 - 24 h bei 37 °C.

Zur Kultivierung der Bakterien in Softagar wurde Brain-Heart-Infusion verwendet. Dieses Nährmedium setzte sich wie folgt zusammen:

**Brain-Heart-Infusion (BHI; Hirn-Herz-Bouillon, Merck):**

Hirn-, Herzextrakt und Peptone (Nährsubstrat)	27,5 g
Glucose	2,0 g
NaCl	5,0 g
Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ )	2,5 g
Aqua dest.	1000 ml
pH: 7,4 ± 0,2	



Die Bouillon wurde nach den Angaben des Herstellers angefertigt, mit 0,2 % Agar (Merck) versetzt, zu je 10 ml in Reagenzgläser abgefüllt und für 1 h bei 95 °C im Dampftopf erhitzt. Die Bebrütung erfolgte für 18 – 24 h bei 37 °C.

Der Nachweis von Antibiotikaempfindlichkeiten erfolgte auf Mueller-Hinton-Blutagar. Das Medium setzte sich wie folgt zusammen:

**Mueller-Hinton-Nährboden (Oxoid):**

getrocknete Infusion aus 300 g Rindfleisch	2,0 g
Caseinhydrolysat	17,5 g
Stärke	1,5 g
Agar	17,0 g
Aqua dest.	1000 ml
pH 7,4 ± 0,2	

Dem nach den Angaben des Herstellers angefertigten Medium wurden nach dem Autoklavieren (15 min, 121 °C) und nachfolgendem Abkühlen auf 45 - 50 °C 5 % aseptisch entnommenes, defibriertes Schafblut zugesetzt. Die Bebrütung erfolgte unter aeroben Bedingungen für 18 – 24 h bei 37 °C.

### 3.3 Konventionelle Identifizierung

Die konventionelle Identifizierung der Kulturen erfolgte im wesentlichen nach Angaben von ROTTA (1986), LÄMMLER und HAHN (1994) sowie HOLT et al. (1994). Zur Beurteilung wurden in der vorliegenden Untersuchung kulturmorphologische, biochemische und serologische Eigenschaften herangezogen.

#### 3.3.1 Kulturmorphologie und Hämolyseformen

Die Anzüchtung der Bakterienkulturen erfolgte nach 3.2 auf Columbia-Blutagar. Dies ermöglichte eine Aussage über die Kulturmorphologie und im weiteren über die Hämolyseformen. Hierzu wurden die Agarplatten im unterbrochenen

Ausstrichverfahren beimpft und für 24 h bei 37 °C unter aeroben Bedingungen bebrütet. Eine Beurteilung erfolgte anhand folgender Kriterien:

- Koloniegroße
- $\alpha$ -Hämolysen: Die Kolonien waren von vergrünenden Höfen umgeben.
- $\beta$ -Hämolysen: Die Kolonien waren von einer mehr oder weniger breiten Zone vollständiger Hämolysen umgeben.
- $\gamma$ -Hämolysen: Auch in unmittelbarer Umgebung der Kolonien blieben die Erythrozyten unverändert.

### 3.3.2 CAMP-Test

Für den CAMP-Test wurde auf einer Schaf- bzw. auf einer Rinderblutagarplatte (3.2) die  $\beta$ -hämolisierende *S. aureus*-Kultur (Stamm *Pertsch*) ausgestrichen. Im rechten Winkel zu diesem Staphylokokken-Impfstrich erfolgte der Ausstrich der zu untersuchenden Streptokokkenkulturen, wobei zwischen der *S. aureus*-Kultur und den Streptokokken ein Abstand von 3 - 4 mm verblieb. Die *S. agalactiae*-Kultur COH 1 diente als CAMP-positiver Kontrollstamm. Die Inkubation der beimpften Platten erfolgte anschließend für 18 - 24 h bei 37 °C unter aeroben Bedingungen. Als positive CAMP-Reaktion wurde nach CHRISTIE et al. (1944) eine halbmondförmige Zone vollständiger Hämolysen im Bereich der unvollständigen Staphylokokken- $\beta$ -Hämolysen bewertet.

### 3.3.3 Biochemische Reaktionen

#### 3.3.3.1 Abbau von Kohlenhydraten

Für die Beurteilung der Fähigkeit der Kulturen zum Abbau verschiedener Kohlenhydrate wurden dem Grundmedium, bestehend aus 5 ml Phenolrot-Bouillon (Merck), die Zucker Arabinose, Glucose, Inulin, Lactose, Maltose, Mannit, Saccharose, Salicin, Sorbit bzw. Trehalose (Merck) in einer Endkonzentration von 1 % hinzugefügt.

Im Anschluss an das Beimpfen des Mediums mit den zu untersuchenden Streptokokkenkulturen erfolgte die Inkubation für 18 - 24 h bei 37 °C unter aeroben Bedingungen. Die Abbaureaktionen konnten aufgrund des Farbumschlags des Indikators beurteilt werden. Eine positive Reaktion, d. h. der Abbau des enthaltenen Zuckers, zeigte sich in einer deutlichen Gelbfärbung des Mediums. War der Streptokokkenstamm nicht in der Lage, den vorgegebenen Zucker abzubauen, blieb das Medium rot.

### **3.3.3.2 Hydrolyse von Esculin**

Zum Nachweis der Hydrolyse des Glycosids Esculin erfolgte die Zugabe von 0,1 % Esculin (Merck) und 0,05 % Eisen-(III)-Citrat (Merck) zu einem Grundmedium, bestehend aus 5 ml Brain-Heart-Infusion (BHI, Merck). Die beimpften Reagenzröhrchen wurden unter aeroben Bedingungen für 18 - 24 h bei 37 °C inkubiert. Im positiven Fall führte der Abbau des Esculins zu Esculetin und Glucose in Anwesenheit von Eisen-(III)-Citrat zu einer Schwarzfärbung des Mediums.

### **3.3.3.3 Hydrolyse von Natrium-Hippurat**

Der Nachweis der Natrium-Hippurat-Hydrolyse erfolgte nach HWANG und EDERER (1975) durch Inokulation der zu untersuchenden Streptokokkenkulturen in 0,4 ml einer wässrigen 1 %-igen Natrium-Hippurat-Lösung (Sigma, Deisenhofen) und nachfolgender Inkubation für 2 h bei 37 °C. Anschließend wurden der Suspension 0,2 ml einer 3,5 %-igen Ninhydrin-Lösung (50 ml Aceton, 50 ml Butanol, 3,5 g Ninhydrin; Sigma) zugegeben. Nach einer erneuten Inkubation für 10 min bei 37 °C färbte sich das Medium im positiven Fall blauviolett.

## **3.3.4 Serologische Gruppenbestimmung**

### **3.3.4.1 Extraktion des Gruppenantigens**

Bei der von RANTZ und RANDALL (1955) beschriebenen Methode zur Extraktion des Gruppenpolysaccharidantigens handelte es sich um eine Extraktion durch

Autoklavieren. Die Anzüchtung der Streptokokkenkulturen erfolgte nach 3.2 in 40 ml THB. Nach dem Zentrifugieren der Bakteriensuspension (10 min, 10000 x g, Heraeus Sepatech Biofuge 22 R, Heraeus Instruments GmbH, Hanau) wurde das Bakteriensediment zunächst in 5 ml 0,14 mol/ l NaCl resuspendiert und erneut zentrifugiert (10 min, 10000 x g). Dem Verwerfen des Überstandes folgte das Resuspendieren des Sedimentes in 0,5 ml 0,14 mol/ l NaCl und die Neutralisation durch Zugabe von 1 mol/ l NaOH, wobei 0,05 %-iges alkoholisches Phenolrot (Merck) als Indikator diente. Diese Suspension wurde autoklaviert (15 min, 121 °C) und erneut zentrifugiert (5 min, 13000 x g, Heraeus Sepatech Biofuge 13, Heraeus Instruments). Das Gruppenantigen im Überstand konnte anschließend durch serologische Reaktionen nachgewiesen werden.

#### 3.3.4.2 Doppelimmundiffusion nach Ouchterlony

Zum serologischen Nachweis des Gruppenantigens wurde zunächst in einem Becherglas eine Agaroselösung hergestellt, bestehend aus 0,4 g Agarose (Standard EEO, Serva, Heidelberg), 1,2 g Polyethylenglycol (PEG 6000, Roth, Karlsruhe) und 0,02 g Natriumazid (Merck), gelöst in 20 ml Aqua dest. und 20 ml Phosphatpuffer (0,5 mol/ l PBS). Der Phosphatpuffer setzte sich wie folgt zusammen:

NaCl (0,14 mol/ l)	8,0	g
KCl	0,2	g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,44	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24	g
Aqua dest.	1000	ml
pH 7,5		

Diese Mischung wurde bis zur völligen Auflösung der Agarose und des PEG in einer Mikrowelle gekocht und für 5 min in einem Wasserbad bei 56 °C abgekühlt. Daran schloss sich das Auftragen der Agaroselösung mit einer Pipette auf eine Schiene mit 6 Objektträgern an. Dem Erstarren des Gels folgte das Ausstanzen eines Zentralloches und von 4 Marginallöchern mit einer Gelstanze (LKB, Stockholm, Schweden) und das

Ausheben der Löcher mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe. Die im Durchmesser 2,5 mm großen Marginallöcher wurden mit 10 µl der nach 3.3.4.1 gewonnenen Antigensuspension gefüllt, das Zentralloch mit 5 µl des Gruppe B-spezifischen Antiserums, ursprünglich hergestellt von Prof. Dr. Ch. Lämmle (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Justus-Liebig-Universität Gießen). Die Präzipitationsreaktion konnte nach 24 h bei Zimmertemperatur in einer feuchten Kammer abgelesen werden.

### 3.3.4.3 Staphylokokken-Koagglutination

Für die Staphylokokken-Koagglutination, die nach den Angaben von CHRISTENSEN et al. (1973) erfolgte, wurde die *S. aureus*-Kultur Cowan I in 40 ml THB für 18 – 24 h bei 37 °C angezüchtet, abzentrifugiert (10 min, 10000 x g, Heraeus Sepatech Biofuge 22), anschließend 2 x in 10 ml 0,14 mol/ l NaCl gewaschen und letztlich in 1 ml 0,14 mol/ l NaCl resuspendiert. Daran schloss sich eine 1-stündige Hitzeinaktivierung im Wasserbad bei 60 °C an. Von dieser Cowan I - *S. aureus*-Suspension wurden 350 µl mit 50 µl des monospezifischen Antiserums gegen das Gruppenpolysaccharid B für 15 – 30 min bei Raumtemperatur unter rotierendem Schwenken (Celloshaker Variospeed, Biotec-Fischer GmbH, Reiskirchen) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Suspension in 0,4 ml 0,2 mol/ l Tris-HCl-Puffer (pH 6,8) und 0,1 % Tween 20 ® (Sigma) (5 min, 13000 x g, Heraeus Sepatech Biofuge 13) erfolgte das Resuspendieren des Sedimentes in 0,4 ml desselben Puffers. Auf einem Objektträger wurden anschließend 10 µl der mit Antikörpern beladenen Staphylokokkensuspension und 10 µl der nach 3.3.4.1 extrahierten Gruppenantigene der B-Streptokokken unter rotierendem Schwenken für ca. 30 s vermischt. Eine positive Reaktion zeigte sich in einer deutlichen Agglutination.

### **3.4 Molekulare Identifizierung mittels Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR)**

#### **3.4.1 PCR-Analyse des 16S rRNA-Gens**

##### **3.4.1.1 Präparation der bakteriellen DNA**

Zur Aufbereitung der als „template“ verwendeten DNA kam eine ursprünglich von BENTLEY et al. (1993) beschriebene und von ABDULMAWJOOD und LÄMMLER (1999) modifizierte Methode zum Einsatz. Dazu erfolgte zunächst die Subkultivierung der zu untersuchenden Streptokokken nach 3.2 auf Columbia-Blutagar und deren Inkubation unter aeroben Bedingungen für 18 - 24 h bei 37 °C. Zur Präparation der bakteriellen DNA wurden fünf bis zehn Kolonien der jeweiligen Kulturen in 100 µl TE-Puffer in 1,5 ml Reaktionsgefäßen (Sarstedt, Nümbrecht) suspendiert. Der TE-Puffer setzte sich wie folgt zusammen:

Tris-HCl (10 mmol/ l)	1,21 g
EDTA (1 mmol/ l)	372,5 mg
Aqua dest.	1000 ml
pH 7,6	

Die Zugabe von 5 µl Mutanolysin (10 U/ µl; Sigma) zu der Suspension und die Inkubation für 1 h bei 37 °C im Wasserbad führten zur Auflösung der Bakterienzellwand. Die Deproteinisierung erfolgte durch Zugabe von 10 µl Proteinase K (14,8 mg/ ml, Boehringer, Mannheim) für 2 h bei 56 °C im Wasserbad, die Inaktivierung der Proteinase K durch zehnminütiges Kochen der Probe. Anschließend wurde die Probe zentrifugiert (15 s, 10000 x g, Zentrifuge 3200, Netheler & Hinz GmbH, Eppendorf) und 2,5 µl des Überstandes als „template“ in die PCR eingesetzt.

### 3.4.1.2 Amplifizierung eines speziesspezifischen Abschnitts des 16S rRNA-Gens

Zur Amplifizierung eines speziesspezifischen Abschnitts des 16S rRNA-Gens von *S. agalactiae* wurden die von ABDULMAWJOOD und LÄMMLER (1999) beschriebenen Primer agal I mit der Sequenz 5'-ATA AGA GTA ATT AAC ACA TGT TAG-3', spezifisch für die V2-Region des 16S rRNA-Gens von *S. agalactiae*, und agal II mit der Sequenz 5'-ACT TCG GGT GTT ACA AAC -3' verwendet. Die Primer wurden von MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen. Das Pipettieren des Mastermixes, hier für einen Reaktionsansatz dargestellt, erfolgte nach dem Protokoll:

Aqua bidest.	19,9 µl
Inkubationspuffer	3,0 µl (10x Buffer, Promega, Mannheim)
MgCl <sub>2</sub>	1,8 µl (25 mmol/ l, Promega)
dNTP	0,6 µl (10 mmol/ l, MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
Primer I	1,0 µl (10 pmol/ l)
Primer II	1,0 µl (10 pmol/ l)
Taq-DNA-Polymerase	0,2 µl (5 U/ µl, Promega)

Zur Herstellung eines Mastermixes für mehrere Reaktionsansätze wurden die Inhaltsangaben mit der Anzahl der gewünschten Ansätze entsprechend multipliziert. Nach gründlichem Mischen wurden jeweils 27,5 µl des Mastermixes pro Reaktionsansatz zusammen mit 2,5 µl der nach 3.4.1.1 präparierten DNA in 0,2 ml - Reaktionsgefäße (Sarstedt) pipettiert. Die anschließende PCR fand im Thermocycler (Techne-Progene, Thermodux, Wertheim bzw. Personal Cycler, Biometra, Göttingen) statt. Das Temperaturprogramm umfasste folgende Schritte:

1 Zyklus	94 °C	4 min	initiale Denaturierung
30 Zyklen	94 °C	1,5 min	Denaturierung
	58 °C	1,5 min	Primeranlagerung
	72 °C	1,5 min	Polymerisierung
1 Zyklus	72 °C	5 min	Renaturierung

Bis zur Entnahme verblieben die Proben bei 4 °C im Thermocycler.

### 3.4.1.3 Agarosegelelektrophorese

Der Nachweis der Amplifikate der PCR erfolgte durch Elektrophorese in einem 2,0 %-igen Agarosegel. Zur Herstellung des Agarosegels wurden 2,2 g NEEO-Agarose (Roth) in 110 ml 1 x Tris-Acetat-Puffer (TAE) suspendiert. Als Ausgangspuffer diente 50 x TAE-Puffer, hergestellt nach den Angaben von SAMBROOK et al. (1989). Der Puffer setzte sich wie folgt zusammen:

Tris-Basis	(40 mmol/ l, Roth)	242,0 g
Eisessig	(1,14 mol/ l)	57,1 ml
EDTA	(0,5 mol/ l)	100 ml
Aqua dest.		1000 ml
pH 7,8		

Diese Mischung wurde bis zum vollständigen Auflösen in der Mikrowelle gekocht, im Wasserbad auf 56 °C abgekühlt, in eine mit einem Kamm versehene Gelform gegossen und bis zum Erstarren des Gels bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach der Entfernung des Kammes wurden 12 µl des PCR-Produkts mit 3 µl 6 x „Loading Solution“ (MBI Fermentas) vermischt, in die Kammern des Agarosegels pipettiert und bei 120 mA für 2,5 h in einer Elektrophoresekammer aufgetrennt. Als Laufpuffer diente 1x TAE-Puffer. Für die Bestimmung der Größe des PCR-Produkts wurde ein Längenstandard (100 Bp DNA Ladder, Gibco BLR, Eggenstein) verwendet.

### 3.4.1.4 Ethidiumbromidfärbung

Der Darstellung der Fragmente ging nach der Gelelektrophorese das Färben des Gels mit einer wässrigen Ethidiumbromid-Lösung (5 µg/ ml, Sigma) für 5 min voraus. Der fluoreszierende Farbstoff Ethidiumbromid lagerte sich dabei als interkalierende Substanz in die Doppelstränge der DNA ein. Zur Entfernung des überschüssigen Farbstoffs wurde das Gel durch Schwenken in Aqua dest. (20 min bei Raumtemperatur) entfärbt und anschließend unter UV-Licht fotografiert (Pharmacia Biotech Image Master ® VDS, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg i. Br.). Die DNA-Fragmente stellten sich als helle Streifen vor dunklem Hintergrund dar.



### 3.4.2 Amplifizierung der 16S-23S rDNA „intergenic spacer“-Region

Die 16S-23S rDNA „intergenic spacer“-Region wurde mit den von KOSTMAN et al. (1995) bzw. CHANTER et al. (1997) beschriebenen Primern 1 bzw. c mit der Sequenz 5'-TTG TAC ACA CCG CCC GTC A-3' und den Primern 2 bzw. b mit der Sequenz 5'-GGT ACC TTA GAT GTT TCA GTT C-3' amplifiziert. Die Präparation der bakteriellen DNA erfolgte nach 3.4.1.1. Der Mastermix wurde nach 3.4.1.2 hergestellt. Das PCR-Temperaturprogramm entsprach ebenfalls den Angaben unter 3.4.1.2.

### 3.4.3 Amplifizierung eines speziesspezifischen Abschnitts der 16S-23S rDNA „intergenic spacer“-Region

Bei der Amplifizierung eines *S. agalactiae*-spezifischen Abschnitts der 16S-23S rDNA „intergenic spacer“-Region kamen die von FORSMAN et al. (1997) beschriebenen speziesspezifischen Primer STRA-AgI mit der Sequenz 5'-GGA AAC CTG CCA TTG CG-3' und STRA-AgII mit der Sequenz 5'-TAA CTT AAC CTT ATT AAC CTA G-3' zum Einsatz. Der Mastermix wurde nach den unter 3.4.1.2 beschriebenen Angaben hergestellt. Das anschließende PCR-Temperaturprogramm umfasste folgende Schritte:

1 Zyklus	94 °C	4 min	Denaturierung
30 Zyklen	94 °C	30 s	Denaturierung
	58 °C	30 s	Primeranlagerung
	72 °C	30 s	Polymerisierung
1 Zyklus	72 °C	5 min	Renaturierung

### 3.4.4 Amplifizierung des CAMP-Faktor Gens (*cfb*)

Zur Amplifizierung des CAMP-Faktor-Gens (*cfb*) von *S. agalactiae* wurden die von PODBIELSKI et al. (1994) beschriebenen Primer camp 13 mit der Sequenz 5'-ATC GTT ATG GTT TTT ACA TGA-3' und clon 2 mit der Sequenz 5'-TTA TTT TAA TGC TGT TTG AAG TG-3' verwendet und die PCR mit dem unter 3.4.1.2 beschriebenen Temperaturprogramm durchgeführt.

## 3.5 Phäno- und genotypische Charakterisierung

### 3.5.1 Typisierung

#### 3.5.1.1 Extraktion der Typenantigene

Eine Beschreibung der Extraktion der Typenantigene von Streptokokken der Serogruppe B erfolgte ursprünglich durch LANCEFIELD (1934). Die Typenantigenextraktion der zu untersuchenden Kulturen wurde nach den Angaben von PATTISON et al. (1955a) sowie JELINKOVA (1977) durchgeführt. Dazu erfolgte die Anzüchtung der zu untersuchenden Streptokokkenkulturen nach 3.2 in 40 ml THB für 18 – 24 h bei 37 °C unter aeroben Bedingungen. Anschließend wurden die Bakteriensuspensionen zentrifugiert (10 min, 10000 x g, Heraeus Sepatech Biofuge 22), der Überstand verworfen, das Sediment in 5 ml 0,14 mol/l NaCl resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wiederholte sich nochmals. Das Bakteriensediment wurde schließlich in 0,35 ml 0,2 mol/l HCl resuspendiert und 2 h bei 56 °C im Wasserbad inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 1 mol/l NaOH bis zur Neutralisation der Suspension, wobei Phenolrot als Indiktor diente. Nach der anschließenden Zentrifugation (5 min, 13000 x g, Heraeus Sepatech Biofuge 13) konnten die Typenantigene im Überstand nachgewiesen werden.

### 3.5.1.2 Absorption der typenspezifischen Antiseren

Zur Herstellung monospezifischer Antiseren wurden die von Herrn Prof. Dr. Ch. Lämmle (Institut für Pharmakologie und Toxikologie) freundlicherweise zur Verfügung gestellten Antiseren mit den jeweils kreuzreagierenden B-Streptokokkenreferenzkulturen bzw. mit weiteren B-Streptokokkenkulturen definierten Serotyps absorbiert. Dazu erfolgte zunächst die Anzüchtung dieser Kulturen nach 3.2 in 40 ml THB für 18 – 24 h bei 37 °C unter aeroben Bedingungen. Daran schloss sich das Zentrifugieren der Bakteriensuspensionen (10 min, 10000 x g, Heraeus Sepatech Biofuge 22), das Verwerfen des Überstandes, das Resuspendieren des Bakteriensedimentes in 10 ml 0,14 mol/l NaCl und das erneute Zentrifugieren an. Dieser Schritt wiederholte sich nochmals. Das Bakteriensediment wurde anschließend in 2 ml 0,14 mol/l NaCl resuspendiert und für 2 h im Wasserbad bei 60 °C inaktiviert. Dieser Hitzeinaktivierung folgte die Absorption der Antiseren. Dazu wurde ein Teil des zu absorbierenden Antiserums mit einem Teil der inaktivierten Bakteriensuspension (Tab. 2) für 2 – 4 h bei 37 °C unter ständiger Rotation (Thermomixer 5436, Eppendorf AG, Hamburg) inkubiert und anschließend zentrifugiert (5 min, 13000 x g, Heraeus Sepatech Biofuge 13). Die Überprüfung der Monospezifität der absorbierten Antiseren erfolgte mit den nach 3.5.1.1 hergestellten HCl-Extrakten der verschiedenen Typenantigenreferenzstämme.

Tabelle 2

## Absorption der Antiseren

AS	Menge des Antiserums und der verwendeten Bakteriensuspension
<b>Ia</b>	500 µl Ia-AS + 250 µl Ib-BS
<b>Ib</b>	500 µl Ib-AS + 250 µl NF 25 (Ia/cβ)-BS + 250 µl FHBS 12 (IV/cα)-BS
<b>II</b>	500 µl II-AS + 250 µl III-BS
<b>III</b>	500 µl III-AS + 250 µl Stamm 2202/99 (II/Rib)-BS
<b>IV</b>	500 µl IV-AS + 250 µl II-BS + 250 µl VI-BS
<b>V</b>	500 µl V-AS + 250 µl III-BS
<b>VI</b>	500 µl VI-AS + 250 µl II-BS + 250 µl IV-BS
<b>VII</b>	500 µl VII-AS + 250 µl II-BS + 250 µl III-BS
<b>VIII</b>	500 µl VIII-AS + 250 µl X-BS + 250 µl R-BS
<b>R</b>	500 µl R-AS + 250 µl X-BS + 250 µl III-BS
<b>Rib</b>	500 µl Rib-AS + 150 µl R-BS + 250 µl Stamm N 3129 (III)-BS
<b>X</b>	500 µl X-AS + 250 µl R-BS + 250 µl III-BS
<b>cα</b>	500 µl cα-AS + 250 µl NF 25 (Ia/cβ)-BS
<b>cβ</b>	500 µl cβ-AS + 250 µl FHBS 12 (IV/cα)-BS + 250 µl Stamm 2202/99 (II/Rib)-BS

AS = Antiserum

BS = Bakteriensuspension eines kreuzreagierenden B-Streptokokkenstammes definierten Serotyps zur Absorption der Antiseren

Zur Serotypisierung wurde neben den absorbierten Antiseren auch das von WIBAWAN (1993) beschriebene monospezifische Antiserum gegen das Proteinantigen X eingesetzt, welches ebenfalls freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Ch. Lämmle (Institut für Pharmakologie und Toxikologie) bereitgestellt worden war. Die Bezeichnung dieses Antiserums lautete X<sub>F</sub>.

### 3.5.1.3 Nachweis der Typenantigene

#### 3.5.1.3.1 Doppelimmundiffusion nach Ouchterlony

Die Durchführung der Doppelimmundiffusion nach OUCHTERLONY (1949) erfolgte, wie unter 3.3.4.2 beschrieben. In die jeweiligen Zentrallöcher wurden 5 µl der nach 3.5.1.2 absorbierten monospezifischen Antiseren pipettiert. Die Marginallöcher enthielten 10 µl der nach 3.5.1.1 extrahierten Typenantigensuspensionen der zu untersuchenden *S. agalactiae*-Kulturen.

#### 3.5.1.3.2 Staphylokokken-Koagglutination

Die Staphylokokken-Koagglutination erfolgte nach 3.3.4.3. Nach der einstündigen Hitzeinaktivierung bei 60 °C wurden 350 µl der Cowan I - *S. aureus*-Suspension mit 50 – 70 µl der nach 3.5.1.2 hergestellten monospezifischen Antiseren gegen die Ia-, Ib-, III-, X-, R-, Rib-, cα- und cβ-Typenantigene für 15 – 30 min bei Raumtemperatur unter rotierendem Schwenken (Celloshaker Variospeed, Biotec-Fischer, Reiskirchen) inkubiert. Die weitere Behandlung erfolgte, wie unter 3.3.4.3 beschrieben. Auf einem Objektträger wurden anschließend 10 µl der mit Antikörpern beladenen Staphylokokkensuspension und 10 µl der nach 3.5.1.1 hergestellten Extrakte der B-Streptokokken unter rotierendem Schwenken für ca. 30 s vermischt. Eine positive Reaktion zeigte sich in einer deutlichen Agglutination.

#### 3.5.1.4 PCR-vermittelter Nachweis des Proteinantigen Rib-Gens (*rib*)

Für die PCR-Analyse des *rib*-Gens, welches für das Proteinantigen Rib kodiert, wurden die nach 3.4.1.1 hergestellten DNA-Präparationen verwendet. Bei der Amplifizierung des *rib*-Gens von *S. agalactiae* kamen die von YILDIRIM (2002) beschriebenen Primer RibAK 1 mit der Sequenz 5'-GCT GTT ACG TTA AAC ACA AAT ATG A-3' und RibAK 2 mit der Sequenz 5'-CGT TTA TAA TAT CCA CTT GTC CAT C-3' zum Einsatz. Der Mastermix wurde nach 3.4.1.3 hergestellt und die PCR nach folgendem Programm durchgeführt:

1 Zyklus	94 °C	4 min	initiale Denaturierung
25 Zyklen	94 °C	30 s	Denaturierung
	52 °C	30 s	Primeranlagerung
	72 °C	30 s	Polymerisierung
1 Zyklus	72 °C	5 min	Renaturierung

### 3.5.1.5 PCR-vermittelter Nachweis des Proteinantigen c $\beta$ -Gens (*bag*)

Die PCR-Analyse des *bag*-Gens, welches das Proteinantigen c $\beta$  kodiert, erfolgte nach Angaben von MAELAND et al. (1997) mit nach 3.4.1.1 präparierter bakterieller DNA. Zur Amplifizierung des *bag*-Gens von *S. agalactiae* wurden die Primer CBETA I mit der Sequenz 5'-AAG GCT ATG AGT GAG AGC TTG GAG-3' und CBETA II mit der Sequenz 5'-CTG CTC TGG TGT TTT AGG AAC TTG-3' und ein nach 3.4.1.3 hergestellter Mastermix verwendet. Die PCR erfolgte nach dem Programm:

1 Zyklus	94 °C	4 min	initiale Denaturierung
37 Zyklen	94 °C	1 min	Denaturierung
	60 °C	1 min	Primeranlagerung
	72 °C	1 min	Polymerisierung
1 Zyklus	72 °C	5 min	Renaturierung

### 3.5.2 Pigmentbildung

Die Überprüfung der Pigmentbildung der zu untersuchenden *S. agalactiae* erfolgte in GBS-Islam-Agar (Oxoid), dem nach den Angaben des Herstellers zuvor 50 ml steriles Pferdeserum pro Liter Agar hinzuzufügen waren. Die Röhren mit jeweils 5 ml Agar wurden mit Hilfe einer Stichöse beimpft und im Kerzentopf unter mikroaeroben Bedingungen für 18 - 24 h bei 37 °C bebrütet.

Anschließend erfolgte die Beurteilung nach folgendem Schema:

- (+++) rotes Pigment
- (++) orangefarbenes Pigment
- (+) gelbes Pigment
- (-) keine Pigmentbildung.

### **3.5.3 Untersuchung der Wachstumseigenschaften**

#### **3.5.3.1 Wachstum in Flüssigmedium**

Für den Nachweis der Wachstumseigenschaften der Kulturen in Flüssigmedium wurden die *S. agalactiae*-Kulturen nach den unter 3.2 beschriebenen Bedingungen in 10 ml THB für 18 - 24 h bei 37 °C angezüchtet, wobei darauf zu achten war, dass die Röhrchen nicht geschüttelt wurden. Die anschließende Beurteilung des Wachstums der Bakterien erfolgte nach WIBAWAN und LÄMMLER (1992a):

- trüb = gleichmäßige Trübung der Bouillon
- klar = Sedimentbildung bei klarem Überstand.

#### **3.5.3.2 Wachstum in Softagar**

Die Überprüfung der Wachstumseigenschaften der zu untersuchenden Kulturen in Softagar erfolgte nach YOSHIDA (1971). Hierfür wurden die *S. agalactiae*-Kulturen nach 3.2 in 10 ml THB für 18 - 24 h bei 37 °C angezüchtet. Die 1:1000 - Verdünnung der Kulturen erfolgte durch Übertragung von 0,01 ml dieser THB-Bouillon in 10 ml 0,14 mol/ l NaCl. Nach sorgfältigem Mischen (Vortex VF2, IKA-Labortechnik, Staufen i. Br.) wurden aus dieser NaCl-Lösung wiederum 0,01 ml in 10 ml des nach 3.2 hergestellten Softagars (BHI + 0,2 % Agar) überimpft, erneut sorgfältig gemischt und 18 – 24 h bei 37 °C bebrütet. Die anschließende Beurteilung des Wachstums der Bakterien in Form kompakter, kompakt-diffuser bzw. diffuser Kolonien erfolgte nach YOSHIDA (1971) sowie nach WIBAWAN und LÄMMLER (1992a).

### 3.5.4 Untersuchung der Oberflächenhydrophobizität

#### 3.5.4.1 Salz-Aggregationstest (SAT)

Für die weitergehende Beurteilung der Oberflächenhydrophobizität der Kulturen kam der SAT nach JONSSON und WADSTRÖM (1984) bzw. eine Modifikation des Tests nach SOEDARMANTO et al. (1996) zum Einsatz. Dazu wurden die Kulturen nach 3.2 in 10 ml THB für 18 - 24 h bei 37 °C unter aeroben Bedingungen angezüchtet, anschließend zentrifugiert (10000 x g, 10 min, Heraeus Sepatech Biofuge 22 R), der Überstand verworfen, das Sediment in 3 ml 0,001 mol/ l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffer (pH 6,8) gewaschen und erneut zentrifugiert (10 min, 10000 x g). Dem Dekantieren des Überstandes folgte das Resuspendieren des Sedimentes in 1 ml desselben Puffers und die photometrische Einstellung der Suspension bei einer Wellenlänge von 620 nm auf eine Transmission von 10 % (Spectronic 20, Bausch & Lomb, New York, USA). Auf einem Objektträger wurden 25 µl dieser Bakteriensuspension mit 25 µl einer Ammoniumsulfat-Lösung aufsteigender Konzentration [ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ : 0,05 mol/ l - 3,2 mol/ l], beginnend mit 0,05 mol/ l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , vermischt. Unter ständigem Schwenken des Objektträgers erfolgte die Beurteilung, bei welcher Ammoniumsulfat-Konzentration die Bakterien erstmals mit den Salzen der Lösung aggregierten. Um eine Selbstaggregation der Bakterienkulturen auszuschließen, wurden je *S. agalactiae*-Kultur 25 µl der Suspension mit 25 µl des Phosphatpuffers als Kontrolle mitgeführt.

#### 3.5.4.2 Hexadecan-Adhärenztest

Als weiterer Test zur Überprüfung der Oberflächenhydrophobizität der B-Streptokokkenkulturen kam der Hexadecan-Adhärenztest nach ROSENBERG et al. (1980) bzw. eine Modifikation dieser Methode nach WIBAWAN und LÄMMLER (1992a) zur Anwendung. Hierzu wurden die Kulturen nach 3.2 in 40 ml THB für 18 - 24 h bei 37 °C angezüchtet, anschließend zentrifugiert (10000 x g, 10 min, Heraeus Sepatech Biofuge 22 R), der Überstand verworfen und das Sediment in 5 ml 0,5 mol/ l PBS (3.3.4.2) resuspendiert. Dem erneuten Zentrifugieren (10000 x g, 10 min) folgte die Resuspendierung des Pellets in 3 ml PBS und die photometrische Einstellung der



Suspension bei einer Wellenlänge von 540 nm auf eine optische Dichte von 0,55 (Spectronic 20). Von dieser Bakteriensuspension wurden 3 ml mit 0,8 ml Hexadecan (Sigma) versetzt und sorgfältig für 30 s mittels eines Reagenzglasschüttlers (Vortex VF2, IKA-Labortechnik) vermischt. Es folgte eine Inkubationszeit von 30 min bei Raumtemperatur. Anschließend konnten die in der wässrigen Phase der Suspension verbliebenen Bakterien photometrisch bei einer Wellenlänge von 540 nm gemessen werden. Als Bezugsgröße dienten je 3 ml der Bakteriensuspension vor der Zugabe des Hexadecans. Der Auswertung der Hexadecan-Adhärenz diente folgende Gleichung:

$$\% \text{ Hexadecan-Adhärenz} = \frac{A_{540} - (A_{540} + \text{Hex})}{A_{540}} \times 100$$

Eine Beurteilung wurde wie folgt vorgenommen:

Adhärenz an Hexadecan	$\geq 80 \%$	→ stark hydrophob
Adhärenz an Hexadecan	50 - 80 %	→ hydrophob
Adhärenz an Hexadecan	$\leq 50 \%$	→ hydrophil

### 3.5.5 Nachweis hämagglutinierender Eigenschaften

#### 3.5.5.1 Gewinnung der Erythrozyten

Zum Nachweis hämagglutinierender Eigenschaften erfolgte die Durchführung des Hämagglutinationstestes mit Kaninchen- und Schafblut. Dazu wurde diesen Spezies Blut entnommen, mit 0,2 mol/ l Natriumcitrat (pH 5,2) als Antikoagulans versetzt, zentrifugiert (10 min, 8000 x g, Heraeus Sepatech Biofuge 22 R) und das Serum verworfen. Anschließend folgte die Suspendierung der Erythrozyten in 1 ml 0,14 mol/ l NaCl und die erneute Zentrifugation. Dieser Schritt wiederholte sich nochmals. Schließlich erfolgte die Verdünnung der Erythrozytensuspension in 0,14 mol/ l NaCl auf eine Endkonzentration von 2 %.

### 3.5.5.2 Hämagglutinationstest

Der Hämagglutinationstest wurde nach Angaben von WIBAWAN et al. (1993b) durchgeführt. Die Anzüchtung der zu untersuchenden Bakterienkulturen erfolgte nach 3.2 in 10 ml THB für 18 - 24 h bei 37 °C unter mikroaeroben Bedingungen im Kerzentopf. Die Bakteriensuspensionen wurden zentrifugiert (10 min, 8000 x g, Heraeus Sepatech Biofuge 22 R), der Überstand verworfen, das Sediment in 5 ml 0,14 mol/ l NaCl resuspendiert, erneut zentrifugiert und schließlich in 1 ml 0,14 mol/ l NaCl resuspendiert. Diesen Vorbereitungsschritten schloss sich die photometrische Einstellung der Bakterien auf 10 % Transmission bei einer Wellenlänge von 620 nm (Spectronic 20) an. Von dieser verdünnten Bakteriensuspension wurden 20 µl auf einen Objektträger pipettiert und mit derselben Menge der nach 3.5.5.1 hergestellten Erythrozytensuspension durch ständige Rotation des Objektträgers vermischt. Die Beurteilung der Hämagglutinationsreaktion erfolgte innerhalb von 30 s:

- ++ = deutliche Hämagglutination
- + = schwache Hämagglutination
- = keine Hämagglutination.

Je 20 µl der entsprechenden Bakterien- bzw. der Erythrozytensuspension, vermischt mit 0,14 mol/ l NaCl, dienten jeweils als Kontrolle, um eine Selbstagglutination ausschließen zu können.

## 3.5.6 Analyse des Enzyms Hyaluronidase

### 3.5.6.1 Dekapsulationstest

Zum Nachweis des Enzyms Hyaluronidase wurde der Dekapsulationstest nach WINKLE (1979) durchgeführt. Dazu erfolgte die s-förmige Beimpfung einer Blutagarplatte mit der mukoid wachsenden *S. equi* subsp. *zooepidemicus*-Kultur W60. Diese im rechten Winkel durchkreuzend, wurden die zu untersuchenden *S. agalactiae*-Kulturen aufgetragen. Nach einer Inkubation für 18 – 24 h bei 37 °C konnte im positiven

Fall eine Hemmung des mukoiden Wachstums von *S. equi* subsp. *zooepidemicus* im Bereich der *S. agalactiae*-Kulturen beobachtet werden.

### 3.5.6.2 PCR-vermittelter Nachweis des Hyaluronidase-Gens (*hyB*)

Der Nachweis des *hyB*-Gens, welches das Enzym Hyaluronidase kodiert, wurde nach GRANLUND et al. (1998) mittels PCR durchgeführt. Die Präparation der bakteriellen DNA erfolgte nach Angaben von YILDIRIM (2002). Dazu wurden die zu untersuchenden Streptokokken zunächst nach 3.4.1.1 behandelt. Der Inaktivierung der Proteinase K diente jedoch der Zusatz von 2 µl PMSF (1 mmol/l) für 1 h bei 56 °C. Dieser Schritt wiederholte sich einmal. Für die Amplifizierung des *hyB*-Gens von *S. agalactiae* kamen die von GRANLUND et al. (1998) beschriebenen Primer Hyl 7 mit der Sequenz 5'-CGT CAA CAG CCA CCC ATA-3' und Hyl 2 mit der Sequenz 5'-CAA ATG ACC ATT CAA CAG GT-3' zum Einsatz. Bei der Herstellung des Mastermixes wurde das kommerzielle GeneAmp XL-PCR-Kit (Applied Biosystems, Weiterstadt) verwendet. Der Mastermix setzte sich nach Angaben des Herstellers wie folgt zusammen:

Aqua bidest.	25,4	µl
Inkubationspuffer	15,0	µl (3,3 x XL-Buffer II)
Mg(Oac) <sub>2</sub>	2,2	µl (25 mmol/l)
dNTP	1,0	µl (16 mmol/l, MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
Primer I	0,8	µl (20 µmol/l)
Primer II	0,8	µl (20 µmol/l)
<i>rTth</i> -DNA-Polymerase	0,8	µl (2 U/µl)

Die PCR wurde im Thermocycler (Perkin Elmer Cetus PE 2400, Applied Biosystems) durchgeführt. Das Temperaturprogramm umfasste folgende Schritte:

1 Zyklus	94 °C	4 min	initiale Denaturierung
32 Zyklen*	94 °C	15 s	Denaturierung
	60 °C	5 min	Primeranlagerung

\* Während der zweiten 16 Zyklen wurde die Primeranlagerung pro Zyklus um jeweils 15 s verlängert.

### 3.5.6.3 PCR-Analyse des Insertionselementes IS 1548

Die PCR-Analyse des von GRANLUND et al. (1998) beschriebenen Insertionselementes IS 1548, welches sich bei B-Streptokokken innerhalb des *hyB*-Gens befinden kann, erfolgte nach der Präparation der bakteriellen DNA (3.4.1.1). Für die Amplifizierung wurden die von YILDIRIM (2002) beschriebenen Primer IS-I mit der Sequenz 5'-GTT GAT GTG AGT GAA GGT TG-3' und IS-II mit der Sequenz 5'-CAT CAA TTT TGA AAA GAT TCC-3' verwendet. Das Pipettieren des Mastermixes erfolgte nach 3.4.1.2. Das PCR-Programm lautete:

1 Zyklus	94 °C	4 min	Denaturierung
30 Zyklen	94 °C	1 min	Denaturierung
	55 °C	1 min	Primeranlagerung
	72 °C	1 min	Polymerisierung
1 Zyklus	72 °C	5 min	Renaturierung

### 3.5.7 Nachweis von Antibiotikaempfindlichkeiten

Die Überprüfung der Antibiotikaempfindlichkeiten der *S. agalactiae*-Isolate erfolgte nach dem vom Bundesamt für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV, Stand VIII 98) empfohlenen Standardverfahren. Dazu wurden 3 - 5 Kolonien der zu untersuchenden Kultur in 3 ml THB inokuliert und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Dem Ausspateln von 0,1 ml dieser Bakteriensuspension auf Mueller-Hinton-Blutagar folgte das Aufbringen von antibiotikahaltigen Testblättchen (Becton-Dickinson, Heidelberg).

Getestet wurden folgende Antibiotika:

Penicillin G	(10 I. E.)
Oxacillin	(5 µg)
Bacitracin	(10 I. E.)
Tetracyclin	(30 µg)
Minocyclin	(30 µg)
Erythromycin	(15 µg)
Clindamycin	(10 µg)
Gentamicin	(10 µg)
Cefotaxim	(10 µg)
Polymyxin B	(300 µg)
Colistin	(10 µg)
Sulphamethoxazol/	
Trimethoprim	(25 µg)

Der Aufbringung dieser Testblättchen folgte eine Diffusionsphase von 20 min bei Raumtemperatur und eine Inkubation der Platten für 18 – 24 h bei 37 °C. Anschließend fand die Beurteilung der Empfindlichkeit der Kulturen aufgrund der jeweiligen Hemmhofgröße nach den Angaben des BgVV (Stand XII 99) statt.

### **3.6 DNA-„fingerprinting“**

#### **3.6.1 Präparation der bakteriellen DNA**

Zur Erstellung eines DNA-„fingerprints“ erfolgte zunächst die Präparation der bakteriellen Gesamtzell-DNA nach einer modifizierten Methode von MASLOW et al. (1993) sowie THIELE et al. (1993). Dazu wurden die zu untersuchenden Kulturen nach 3.2 in 40 ml THB für 24 – 36 h bei 37 °C unter aeroben Bedingungen angezüchtet. Dem Zentrifugieren der Bakteriensuspensionen (10 min, 10000 x g, Heraeus Sepatech Biofuge 22) und zweimaligem Waschen in TE-Puffer (3.4.1.1) folgte das Resuspendieren des

Bakteriensedimentes in 0,5 ml TE-Puffer und die photometrische Einstellung bei einer Wellenlänge von 620 nm (Spectronic 20) auf eine Transmission von 5 %.

Pro Kultur wurden aus der entsprechenden Bakteriensuspension 3 Agaroseblöckchen hergestellt. Dazu erfolgte die sorgfältige Mischung von jeweils 150 µl der für 5 min im Wasserbad auf 56 °C vorgewärmten photometrisch eingestellten Bakteriensuspension mit 150 µl einer 1,5 %-ige FMC Incert ® Agarose-Lösung ("low melting, low gelling" Incert Agarose, Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldenburg; 0,015 g Agarose, 1 ml TE-Puffer) und das Pipettieren dieser Mischung in eine Gießkammer (100 µl, Bio-Rad Laboratories GmbH, München). Bis zum Erstarren der Agaroseblöckchen wurden die Gelkammern ca. 20 – 30 min auf Eis inkubiert.

Im weiteren folgte der Aufschluß der Bakterienzellwand. Dazu wurden die Blöckchen mit Lysozym (100.000 U/ Blöckchen; Merck) behandelt und in einem Lysispuffer (200 µl/ Blöckchen, pH 7,6) für 24 h bei 37 °C inkubiert. Der Lysispuffer setzte sich wie folgt zusammen:

		Ansatz für 500 ml
1 mol/ l	NaCl	29,3 g
6 mmol/ l	Tris-Basis (Roth)	363 mg
100 mmol/ l	EDTA (Titriplex III, Merck)	18,61 g
0,5 %	Brij-58 (Polyoxyethylene-20-Cetyl-Ether; Sigma)	2,5 g
0,5 %	Na-Lauroylsarcosin (Sigma)	2,5 g
0,2 %	Desoxycholat (Sigma)	1,0 g
Aqua bidest		500 ml

Zur Deproteinisierung erfolgte die Zugabe von 5 µl Proteinase K pro Blöckchen (15,6 mg/ ml Stammlösung, Roche Diagnostics, Mannheim) und eine Inkubation für 24 h bei 56 °C. Anschließend wurden die Agaroseblöckchen zweimal mit TE-Puffer (200 µl/ Blöckchen) gewaschen und darin jeweils 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch den Zusatz von 2 µl Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, Endkonzentration 1 mmol/ l; Sigma) pro Blöckchen zu je 200 µl TE-Puffer kam es während einer Inkubation für 1 h bei 56 °C zu einer Inaktivierung der Proteinase K. Dieser Schritt wiederholte sich ebenfalls einmal. Daran schloss sich das zweimalige Waschen der Blöckchen in TE-

Puffer (200 µl/ Blöckchen) und eine Inkubation für jeweils 30 min bei Raumtemperatur an. Die präparierte DNA in den Agaroseblöckchen konnte im weiteren sofort mit Restriktionsenzymen verdaut bzw. in 1 ml TE-Puffer bei 4 °C gelagert werden.

Die Kulturen des Betriebes V mussten einem anderen Lysevorgang unterzogen werden.

Die Inkubation der Agaroseblöckchen erfolgte jeweils mit 300.000 U Lysozym in 200 µl Lysispuffer für 24 h bei 37 °C. Dieser Schritt wiederholte sich einmal. Nach weiteren 24 h wurden die Blöckchen mit jeweils 10 µl Proteinase K behandelt und über 24 h bei 56 °C inkubiert. Das Waschen der Agaroseblöckchen erfolgte wie bereits beschrieben.

### 3.6.2 Restriktionsverdau der Gesamtzell-DNA

Für die Erstellung eines DNA-„fingerprints“ wurden in der vorliegenden Arbeit die Restriktionsendonukleasen *ApaI*, *SmaI* (New England BioLabs, Frankfurt) bzw. *SalI* (Stratagene Europe, Amsterdam, Niederlande) verwendet. Die Restriktionsansätze setzten sich wie folgt zusammen:

#### 1. Verdau mit der Restriktionsendonuklease *ApaI* (Ansatz pro Blöckchen):

Puffer (1 x NE-Buffer 4)	20 µl
Bovines Serumalbumin (10 x BSA)	20 µl
20 U <i>ApaI</i> (10000 U/ ml)	2 µl
Aqua dest.	158 µl

Der Verdau erfolgte für 20 h bei 25 °C.

#### 2. Verdau mit der Restriktionsendonuklease *SmaI* (Ansatz pro Blöckchen):

Puffer (1 x NE-Buffer 4)	20 µl
BSA (10 x BSA)	20 µl
40 U <i>SmaI</i> (20000 U/ ml)	2 µl
Aqua dest.	158 µl

Die Agaroseblöckchen wurden für 6 h bei 25 °C inkubiert.

3. Verdau mit der Restriktionsendonuklease *SaII* (Ansatz pro Blöckchen):

Puffer (10 x Universal Buffer)	20 µl
30 U <i>SaII</i> (15000 U/ ml)	2 µl
Aqua dest.	178 µl

Der Verdau erfolgte für 20 h bei 37 °C.

### 3.6.3 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

Die Auftrennung der Fragmente der nach 3.6.1 präparierten und nach 3.6.2 verdauten bakteriellen Gesamtzell-DNA erfolgte mittels PFGE in einem 1,1 %-igen Agarosegel. Zur Herstellung des Gels wurden 1,54 g Agarose („Molecular Biology Certified“-Agarose, Bio-Rad) in 140 ml 0,5 x Tris-Borat-Puffer (TBE) aufgelöst. Als Ausgangspuffer diente 10 x TBE-Puffer, der nach den Angaben von SAMBROOK et al. (1989) hergestellt wurde und sich wie folgt zusammensetzte:

Tris-Basis	(45 mmol/ l, Roth)	108 g
Borat		55 g
EDTA	(0,5 mol/ l )	40 ml
Aqua dest.		1000 ml
pH 8,0		

Diese Agaroselösung wurde bis auf 2 ml in eine 13 x 14 x 1 cm Flachbettform (Bio-Rad), in welche ein Kamm mit 10 Stegen eingesetzt wurde, gegossen und bis zum Erstarren ca. 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Im Anschluss an den Restriktionsverdau erfolgte nach der Entnahme des Kammes das Einsetzen der Agaroseblöckchen in die Vertiefungen des Gels. Als Längenstandard dienten Low Range PFG Marker (0,1 – 200 kb, BioLabs) und Lambda Ladder PFG Marker (50 – 1000 kb, BioLabs). Die Vertiefungen wurden mit 2 ml Agaroselösung verschlossen, die vor dem Gießen des Gels der Agaroselösung entnommen worden waren. Die Elektrophorese erfolgte im CHEF-DR II „Pulsed Field Electrophoresis System“ (Bio-Rad). Die Elektrophoresekammer wurde



mit 2 Litern 0,5 x TBE-Puffer als Laufpuffer aufgefüllt. Die Pulsfeldgelelektrophorese fand unter folgenden Bedingungen statt:

*ApaI*-Programm:

	Lauf I
Pulszeiten:	3,4 s – 12,9 s (linearer Gradient)
Spannung:	6 V
Dauer:	8 h
Temperatur:	14 °C

*SmaI*-Programm:

	Lauf I	Lauf II
Pulszeiten:	22,5 s – 30,5 s	0,3 s – 3,0 s
Spannung:	6 V	6 V
Dauer:	15 h	8 h
Temperatur:	14 °C	14 °C

Das Elektrophoreseprogramm für den *SalI*-Verdau wurde in Anlehnung an GORDILLO et al. (1993) durchgeführt.

*SalI*-Programm:

	Lauf I
Pulszeiten:	2,5 s – 6,7 s
Spannung:	6 V
Dauer:	20 h
Temperatur:	14 °C

Im Anschluss an die Elektrophorese folgte das Färben und Waschen des Gels und die Dokumentation nach 3.4.1.4. Die Auswertung wurde mit dem Computerprogramm GelCompar 4.0 (Applied Maths BVBA, Kortrijk, Belgium) durchgeführt, welches der Erstellung eines Dendrogramms diente.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Identifizierung der Kulturen

Bei den 79 von Rindermastitiden isolierten *Streptococcus agalactiae*-Kulturen handelte es sich um grampositive, kettenförmig angeordnete Kokken, die eine negative Katalasereaktion zeigten. Nach einer Inkubation der Kulturen nach 3.2 auf Columbia-Blutagar waren Koloniegrößen von 0,5 mm bis > 2 mm festzustellen. Dabei ließen zwölf (15,2 %) Kulturen eine deutlich ausgeprägte vollständige ( $\beta$ -) Hämolyse erkennen. Die verbleibenden 67 (84,8 %) Kulturen zeigten dagegen eine schmale  $\beta$ -Hämolysezone. Alle untersuchten Isolate erwiesen sich als CAMP-positiv. Die CAMP-Reaktion zeigte sich in Form einer halbmondförmigen Zone vollständiger Hämolyse innerhalb der unvollständigen Staphylokokken- $\beta$ -Hämolysezone. Dieses Phänomen war auf den Rinderblutagarplatten deutlich ausgeprägter als auf den Agarplatten, denen Schafblut zugesetzt worden war. In Tabelle 3 sind diese phänotypischen Eigenschaften zusammengefasst.

Tabelle 3:

Einige Eigenschaften der 79 *S. agalactiae*-Kulturen

Betrieb	n	Koloniegröße in mm			β-Hämolys		CAMP-Reaktion
		0,5	1-2	> 2	deutlich ausgeprägt	schmale Zone	
I	8		8**			8	8
II	12		12		12		12
III	5 / 14*		19			19	19
IV	17 / 8 *	25				25	25
V	6		6			6	6
VI	7		7			7	7
VII	2			2		2	2

n = Anzahl der untersuchten *S. agalactiae*-Kulturen\* = Anzahl der *S. agalactiae*-Kulturen bei erneuter Isolierung nach 8 Monaten

\*\* = Anzahl der Kulturen mit den jeweiligen Eigenschaften

Bei der Untersuchung der biochemischen Eigenschaften zeigten alle 79 *S. agalactiae*-Kulturen die Fähigkeit zum Abbau von Glucose, Lactose, Maltose und Saccharose. Arabinose, Inulin und Mannit konnten dagegen nicht umgesetzt werden. Von den 79 Isolaten waren 35 (44,3 %) Kulturen in der Lage, Salicin abzubauen. Trehalose konnte von 23 (29,1 %) Isolaten umgesetzt werden. Alle Kulturen erwiesen sich als Esculin-negativ und Na-Hippurat-positiv (Tab. 4).

**Tabelle 4:**

**Biochemische Eigenschaften der 79 *S. agalactiae*-Kulturen**

Abbau von:													
Betrieb	n	Arabinose	Glucose	Inulin	Lactose	Maltose	Mannit	Saccharose	Salicin	Sorbit	Trehalose	Esculin	Na-Hippurat
I	8	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+
II	12	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+
III	5/14*	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+
IV	17/8*	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+
V	6	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+
VI	7	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+
VII	2	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+

n = Anzahl der untersuchten *S. agalactiae*-Kulturen

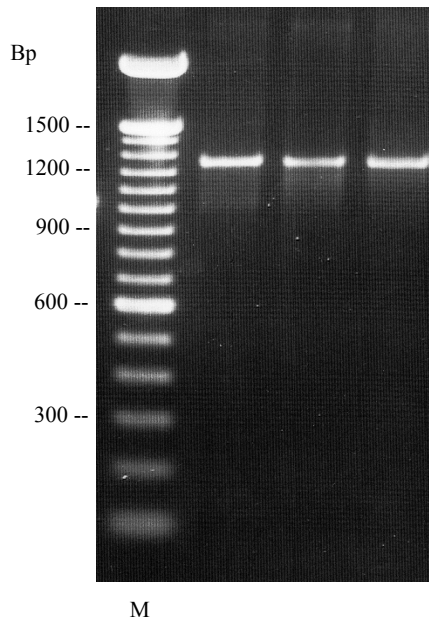
\* = Anzahl der *S. agalactiae*-Kulturen bei erneuter Isolierung nach 8 Monaten

+ = Umsetzung des entsprechenden Substrates

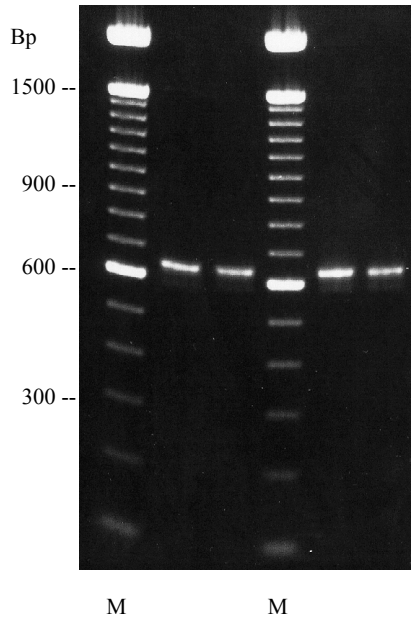
- = fehlende Umsetzung des entsprechenden Substrates

Die durch Autoklavieren gewonnenen Gruppenantigenpräparationen aller 79 Kulturen reagierten in der Doppelimmundiffusion nach Ouchterlony mit Gruppe B-spezifischem Antiserum. Somit konnten alle untersuchten Isolate als Streptokokken der serologischen Gruppe B bzw. als *S. agalactiae* identifiziert bzw. bestätigt werden. Kreuzreaktionen mit den Antiseren der Serogruppen A, C, G und L waren nicht festzustellen.

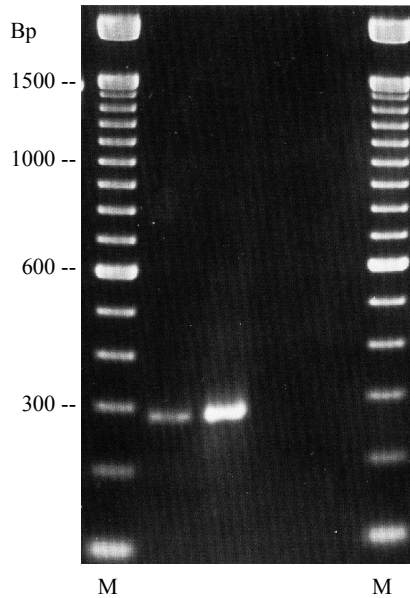
Eine weitergehende Identifizierung der 79 Kulturen als *S. agalactiae* war mit Hilfe molekularer Methoden möglich. Diese basierten auf der unter 3.4 beschriebenen PCR-Amplifizierung von Genabschnitten des 16S rRNA-Gens, der 16S-23S rRNA „intergenic spacer“-Region und des CAMP-Faktor-Gens (*cfb*). Das Amplifikat des *S. agalactiae*-spezifischen Abschnitts des 16S rRNA-Gens wies bei allen untersuchten Kulturen eine einheitliche Größe von 1250 Basenpaaren (Bp) auf (Abb. 2). Die Größe des PCR-Produkts der nach 3.4.2 mit universellen Oligonukleotidprimern amplifizierten 16S-23S rDNA „intergenic spacer“-Region betrug bei allen 79 *S. agalactiae*-Isolaten 650 Bp (Abb. 3). Der nach 3.4.3 mit speziesspezifischen Oligonukleotidprimern amplifizierte Abschnitt der 16S-23S rDNA „intergenic spacer“-Region hatte eine Größe von 290 Bp (Abb. 4). Das nach 3.4.4 amplifizierte CAMP-Faktor-Gen (*cfb*) wies eine Größe von 1026 Bp auf (Abb. 6). Beide speziesspezifischen Amplifikate waren bei allen 79 Kulturen nachweisbar (Tab. 5).



**Abbildung 2:** Amplifizierung eines *S. agalactiae*-spezifischen Abschnitts des 16S rRNA-Gens unter Verwendung der Oligonukleotidprimer agal I und agal II; typische Amplikons mit einer Größe von 1250 Bp; M = Längenstandard (100 Bp Marker, Gibco BRL, Eggenstein).

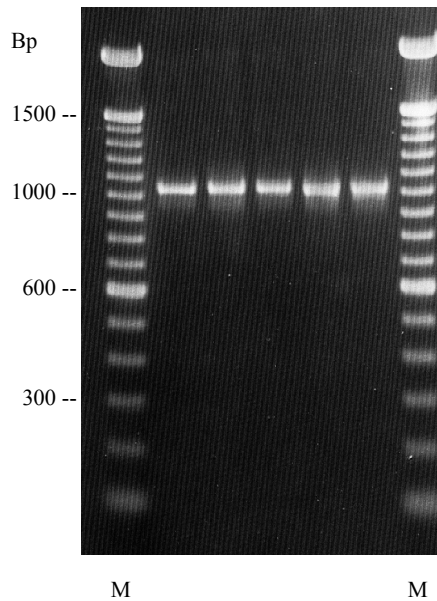


**Abbildung 3: Amplifizierung der 16S-23S rDNA „intergenic spacer“-Region von *S. agalactiae* unter Verwendung universeller Oligonukleotidprimer; typische Amplikons mit einer Größe von 650 Bp; M = siehe Abb. 2.**



**Abbildung 4:** Amplifizierung eines *S. agalactiae*-spezifischen Abschnitts der 16S-23S rDNA „intergenic spacer“-Region unter Verwendung der Oligonukleotidprimer STRA-Ag I und STRA-Ag II; typische Amplikons mit einer Größe von 290 Bp; M = siehe Abb. 2.





**Abbildung 5: Amplifizierung des CAMP-Faktor-Gens (*cfb*) von *S. agalactiae* unter Verwendung der Oligonukleotidprimer camp 13 und clon 2; typische Amplikons mit einer Größe von 1026 Bp; M = siehe Abb. 2.**

**Tabelle 5:****PCR-vermittelter Nachweis speziesspezifischer Genabschnitte von *S. agalactiae***

Betriebe	n	Zielgene und Größe der Amplifikate		
		16S rRNA-Gen 1250 Bp	16S-23S rDNA “intergenic spacer“- Region 650 Bp; 290 Bp	CAMP-Faktor-Gen ( <i>cfb</i> ) 1026 Bp
I – VII	79	+	+	+

n = Anzahl der untersuchten Kulturen

+ = typische Amplikons definierter Größe aller 79 untersuchten Kulturen

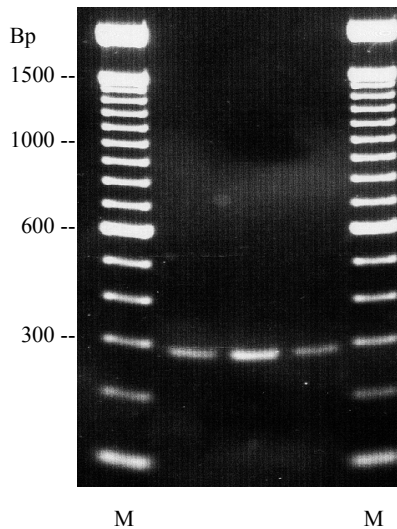
## 4.2 Phäno- und genotypische Charakterisierung

Von den 79 untersuchten *S. agalactiae*-Kulturen konnten mit Hilfe der nach 3.5.1.2 absorbierten typenspezifischen Antiseren 47 (59,5 %) Isolate durch Immundiffusion (3.3.4.2) bzw. Staphylokokken-Koagglutination (3.3.4.3) serotypisiert werden. Innerhalb der 79 untersuchten Isolate wiesen 20 (25,3 %) Kulturen (Betriebe I und II) die Serotypkombination NT/X auf, das heißt bei vorhandenem Proteinantigen X konnte kein Polysaccharidantigen festgestellt werden. Die Kombination Ia/X wurde bei 19 (24,05 %) Kulturen (Betrieb III) nachgewiesen, bei weiteren sechs (7,6 %) Isolaten die Typenantigenkombination III/Rib (Betrieb V). Die Serotypkombination Ib/αß konnte bei zwei (2,5 %) Kulturen (Betrieb VII) festgestellt werden. Die Reaktion des Proteinantigens X mit dem absorbierten X-spezifischen Antiserum konnte mit dem gegen isoliertes Proteinantigen X hergestellten, monospezifischen Antiserum X<sub>F</sub> (3.5.1.2) bestätigt werden.

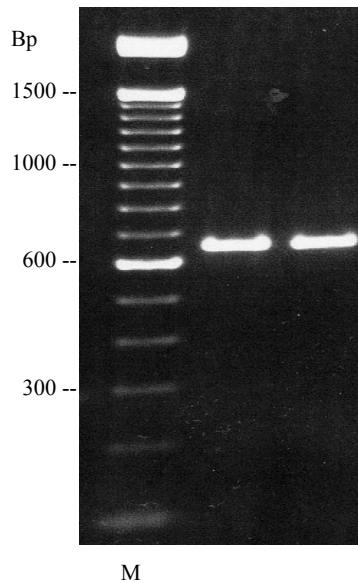
Der PCR-vermittelte Nachweis des *rib*-Gens (3.5.1.4), welches das Proteinantigen Rib kodiert, gelang bei allen sechs *S. agalactiae*-Kulturen des Betriebes V. Das Amplikon wies eine einheitliche Größe von 290 Basenpaaren auf (Abb. 6). Die vergleichsweise untersuchte Typenantigenreferenzkultur BS 30 mit der Serotypkombination III/Rib erwies sich ebenfalls als *rib*-Gen-positiv. Bei den Typenantigenreferenzkulturen 6313 mit dem Serotyp III und Compton 25/60 mit der Serotypkombination NT/R konnte kein entsprechendes *rib*-Gen-Amplifikat nachgewiesen werden.

Der Nachweis der Serotypkombination Ib/c $\alpha$  $\beta$  erfolgte bei den zwei (2,5 %) *S. agalactiae*-Kulturen des Betriebes VII, wobei die  $\beta$ -Komponente des c-Proteins weder durch Immundiffusionsreaktion (3.5.1.3.1) noch durch Staphylokokken-Koagglutination (3.5.1.3.2) feststellbar war. Erst mit Hilfe der nach 3.5.1.5 durchgeführten PCR gelang der Nachweis des das Proteinantigen c $\beta$  kodierenden Gens (*bag*) mit einer Größe von 650 Bp (Abb. 7). Die vergleichsweise untersuchten Typenantigenreferenzkulturen 090 (Ia/c $\alpha$  $\beta$ ), H36B (Ib/c $\alpha$  $\beta$ ) und 70339 (Ia/c $\beta$ /Ra) erwiesen sich ebenso als *bag*-Gen-positiv, ferner die Kulturen definierten Serotyps GHBS 792 (Ia/c $\alpha$  $\beta$ ) und NF 25 (Ia/c $\beta$ ). Das *bag*-Gen konnte bei den Typenantigenreferenzkulturen 6313 (III), Compton 25/60 (NT/R), BS 30 (III/Rib) und 335 (Ia/c $\alpha$ ) und ferner bei der B-Streptokokkenkultur FHBS 12 mit der Serotypkombination IV/c $\alpha$  nicht amplifiziert werden.

Bei keiner der untersuchten Kulturen gelang der Nachweis der Polysaccharidantigene II, IV, V, VI, VII bzw. VIII oder des Proteinantigens R. Innerhalb der einzelnen Betriebe konnten jeweils einheitliche Serotypkombinationen bzw. ein Fehlen jeglicher Typenantigene festgestellt werden. Bei den Erst- und Reisolaten des Betriebes III wurde jeweils die Serotypkombination Ia/X nachgewiesen. Die Erst- und Reisolate des Betriebes IV sowie die Isolate des Betriebes VI waren nicht zu typisieren. In Tabelle 6 sind die Ergebnisse der Serotypisierung der 79 *S. agalactiae*-Kulturen bzw. die Ergebnisse der PCR-vermittelten Gennachweise einiger ausgewählter Isolate zusammengefasst. Tabelle 7 zeigt die Serotypisierungsergebnisse sowie die PCR-vermittelten Gennachweise einiger vergleichsweise untersuchter Typenantigenreferenzkulturen sowie einiger B-Streptokokkenisolate definierten Serotyps.



**Abbildung 6:** Typische Amplikons des *rib*-Gens von *S. agalactiae* mit einer Größe von 290 Bp unter Verwendung der Oligonukleotidprimer RibAK 1 und RibAK 2; M = siehe Abb. 2.



**Abbildung 7:** Typische Amplikons des *bag*-Gens von *S. agalactiae* mit einer Größe von 650 Bp unter Verwendung der Oligonukleotidprimer CBETA I und CBETA II; M = siehe Abb. 2.

Tabelle 6:

Typisierung der 79 *S. agalactiae*-Kulturen mittels Immundiffusionsreaktion, Staphylokokken-Koagglutination und durch PCR-vermittelten Gennachweis

Betrieb	n	Immun- diffusion	Staphylokokken- Koagglutination	PCR-vermittelter Gennachweis		Typen- antigen- muster
				rib- Gen 290 Bp	bag- Gen 650 Bp	
I	8	X	X	- (3**)	- (3)	NT / X
II	12	X	X	- (3)	- (3)	NT / X
III	5/14*	Ia, X	Ia, X	- (2)	- (2)	Ia / X
IV	17/8 *	-	-	- (2)	- (2)	NT
V	6	III, Rib	III, Rib	+ (6)	- (1)	III / Rib
VI	7	-	-	- (1)	- (1)	NT
VII	2	Ib, cα	Ib, cα	- (2)	+ (2)	Ib / cαβ

n = Anzahl der untersuchten *S. agalactiae*-Kulturen

\* = Anzahl der *S. agalactiae*-Kulturen bei erneuter Isolierung nach 8 Monaten

\*\* = Anzahl ausgewählter *S. agalactiae*-Kulturen

NT = nicht typisierbar

+ = typische Amplikons definierter Größe

- = fehlende Reaktion

Tabelle 7:

Typisierung ausgewählter Typenantigenreferenzkulturen und weiterer B-Streptokokkenkulturen mittels Immundiffusionsreaktion, Staphylokokken-Koagglutination und durch PCR-vermittelten Gennachweis

Kultur	Typen- antigen- muster	Immun- diffusion	Staphylokokken- Koagglutination	PCR-vermittelter Gennachweis	
				<i>rib</i> - Gen 290 Bp	<i>bag</i> - Gen 650 Bp
* 090	Ia/cαβ	Ia, cα, cβ	Ia, cα, cβ	n.u.	+
H36B	Ib/cαβ	Ib, cα, cβ	Ib, cα, cβ	n.u.	+
6313	III	III	III	-	n.u.
Compton 25/60	NT/R	R	R	-	-
BS 30	III/Rib	III, Rib	III, Rib	+	n.u.
335	Ia/cα	Ia, cα	Ia, cα	-	-
70339	Ia/cβ/Ra	Ia, cβ, Rib	Ia, cβ, Rib	+	+
** GBS 792	Ia/cαβ	Ia, cα, cβ	Ia, cα, cβ	-	+
NF 25	Ia/cβ	Ia, cβ	Ia, cβ	-	+
FHBS 12	IV/cα	IV, cα	IV, cα	-	-

\* = Typenantigenreferenzkulturen

\*\* = Kontrollstämmen definierten Serotyps

NT = nicht typisierbar

+

- = fehlende PCR-Reaktion

n.u. = nicht untersucht

Nach Anzüchtung der 79 *S. agalactiae*-Kulturen in GBS-Islam-Agar (3.5.2) zeigten 21 (26,6 %) Kulturen die Bildung eines deutlich roten Pigmentes, bei zehn (12,7 %) Kulturen konnte ein orangefarbenes Pigment nachgewiesen werden. Die Bildung eines gelblichen Pigmentes war bei 23 (29,1 %) *S. agalactiae*-Kulturen nachweisbar, während 25 (31,6 %) Isolate unpigmentiert blieben (Tab. 8).

**Tabelle 8:**

**Beziehung zwischen Herkunft, Typenantigenmuster und Pigmentierung der 79 *S. agalactiae*-Kulturen in GBS-Islam-Agar**

Betrieb	n	Typenantigenmuster	Pigmentierung
<b>I</b>	8	NT / X	+
<b>II</b>	12	NT / X	+ (2**) ++ (10)
<b>III</b>	5 / 14*	Ia / X	+++
<b>IV</b>	17 / 8 *	NT	-
<b>V</b>	6	III / Rib	+
<b>VI</b>	7	NT	+
<b>VII</b>	2	Ib / cαβ	+++

n = Anzahl der untersuchten *S. agalactiae*-Kulturen

\* = Anzahl der *S. agalactiae*-Kulturen bei erneuter Isolierung nach 8 Monaten

\*\* = Anzahl der *S. agalactiae*-Kulturen mit dem jeweiligen Merkmal

+++ = deutlich rote Pigmentierung

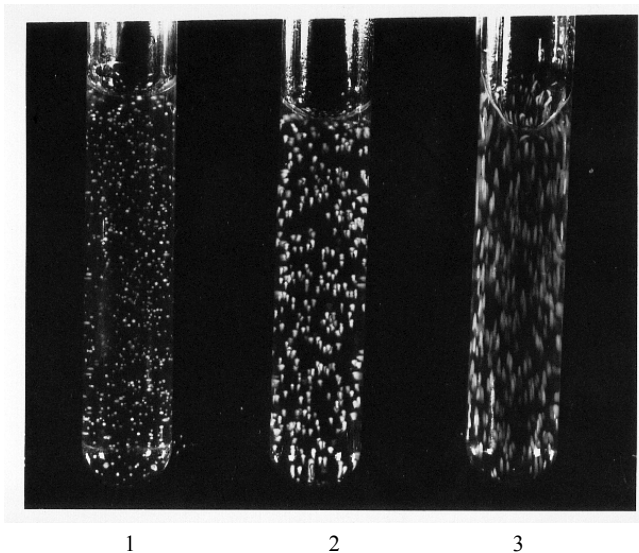
++ = orange Pigmentierung

+

- = keine Pigmentbildung



Von den 79 nach 3.5.3.1 angezüchteten *S. agalactiae*-Kulturen wiesen 73 (92,4 %) Kulturen ein Wachstum mit körnigem Bodensatz und klarem Überstand auf. Die sechs (7,6 %) Kulturen des Betriebes V zeigten dagegen ein Wachstum unter gleichmäßiger Trübung des Flüssigmediums. Nach Anzüchtung der *S. agalactiae*-Isolate in Softagar (3.5.3.2) wuchsen 48 (60,8 %) Kulturen in kompakten Kolonien, 25 (31,6 %) Kulturen in kompakt-diffusen Kolonien und sechs (7,6 %) Kulturen in diffusen Kolonien (Abb. 8). Innerhalb der einzelnen Betriebe zeigten die Kulturen jeweils dieselben Wachstumseigenschaften. Dies konnte auch bei der Erst- und der Nachuntersuchung der Kulturen der Betriebe III und IV festgestellt werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengefasst. Als Kontrollstämme dienen die B-Streptokokkenkulturen COH 1 und COH 1-11.



**Abbildung 8:** Typisches Wachstum von *S. agalactiae* in Softagar mit kompakten (1), kompakt-diffusen (2) und diffusen (3) Kolonien.

Tabelle 9:

**Beziehung zwischen Herkunft, Typenantigenmuster und Wachstumseigenschaften der 79 *S. agalactiae*-Kulturen und der Kontrollkulturen in Flüssigmedium bzw. Softagar**

Betrieb	n	Typenantigenmuster	Wachstum in Flüssigmedium	Wachstum in Softagar
I	8	NT / X	klar	kompakt
II	12	NT / X	klar	kompakt
III	5 / 14*	Ia / X	klar	kompakt
IV	17 / 8 *	NT	klar	kompakt-diffus
V	6	III / Rib	trüb	diffus
VI	7	NT	klar	kompakt
VII	2	Ib / cαβ	klar	kompakt
COH 1	1	n.u.	trüb	diffus
COH 1-11	1	n.u.	klar	kompakt

n = Anzahl der untersuchten *S. agalactiae*-Kulturen

\* = Anzahl der *S. agalactiae*-Kulturen bei erneuter Isolierung nach 8 Monaten

NT = nicht typisierbar

n.u. = nicht untersucht

Eine Analyse der Oberflächenhydrophobizität der *S. agalactiae*-Kulturen erfolgte mit Hilfe des Salz-Aggregationstests (SAT; 3.5.4.1) und des Hexadecan-Adhärenztests (3.5.4.2). Von den 79 Isolaten zeigten 43 (54,4 %) Kulturen bereits bei einer Ammoniumsulfat-Konzentration von 0,05 mol/ l eine Aggregationsreaktion, 18 (22,8 %) Kulturen aggregierten bei einer Salzkonzentration von 0,1 mol/ l und fünf (6,3 %) Kulturen bei einer Ammoniumsulfat-Konzentration von 0,2 mol/ l. Bei einer Konzentration von 0,4 mol/ l konnte bei sieben (8,9 %) weiteren Kulturen eine Salzaggregation festgestellt werden. Die sechs (7,6 %) Kulturen des Betriebes V zeigten

erst bei einer Ammoniumsulfat-Konzentration von 2,4 mol/ l eine entsprechende Reaktion. Aufgrund der Ergebnisse des Hexadecan-Adhärenztests wurden alle 66 (83,5 %) Kulturen der Betriebe I, II, III, IV und VII als stark hydrophob (> 80 % Adhärenz an Hexadecan) beurteilt. Die 7 (8,9 %) *S. agalactiae*-Isolate des Betriebes VI wiesen eine Hydrophobizität zwischen 50 und 80 %, während sich die sechs (7,6 %) Kulturen des Betriebes V hydrophil (< 50 %) verhielten. Als Kontrollstämme dienten die beiden B-Streptokokkenkulturen COH 1 und COH 1-11. Die Ergebnisse des SAT und des Hexadecan-Adhärenztests sind in Tabelle 10 zusammengefasst. Innerhalb der Betriebe konnte eine identische bzw. sehr ähnliche Oberflächenhydrophobizität festgestellt werden. Dies galt auch für die bei der Erst- und Nachuntersuchung isolierten Kulturen der Betriebe III und IV.

Tabelle 10:

Beziehung zwischen Herkunft, Typenantigenmuster und Oberflächenhydrophobizität der 79 *S. agalactiae*-Kulturen und der Kontrollkulturen, untersucht im Salz-Aggregationstest und Hexadecan-Adhärenztest

Betrieb	n	Typen-Antigen-muster	SAT	Hexadecan-Adhärenz (in %)
I	8	NT / X	0,05 mol/ l** (6)*** 0,1 mol/ l (2)	stark hydrophob (> 80 %)
II	12	NT / X	0,1 mol/ l (7) 0,2 mol/ l (5)	stark hydrophob (> 80 %)
III	5 / 14*	Ia / X	0,05 mol/ l (14) 0,1 mol/ l (5)	stark hydrophob (> 80 %)
IV	17 / 8 *	NT	0,05 mol/ l (23) 0,1 mol/ l (2)	stark hydrophob (> 80 %)
V	6	III / Rib	2,4 mol/ l	hydrophil (< 50 %)
VI	7	NT	0,4 mol/ l	mäßig hydrophob (50 - 80 %)
VII	2	Ib / cαβ	0,1 mol/ l	stark hydrophob (> 80 %)
COH 1		n.u.	3,2 mol/ l	27,3 %
COH 1-11		n.u.	0,1 mol/ l	87,0 %

n = Anzahl der untersuchten Kulturen

\* = Anzahl der *S. agalactiae*-Kulturen bei erneuter Isolierung nach 8 Monaten

NT = nicht typisierbar

\*\* = niedrigste Ammoniumsulfat-Konzentration, bei der eine Aggregation auftrat

\*\*\* = Anzahl der Kulturen mit dem jeweiligen Merkmal

n. u. = nicht untersucht

Der nach 3.5.5.2 durchgeführte Hämagglutinationstest ergab, dass von den 79 *S. agalactiae*-Isolaten 37 (46,8 %) Kulturen in der Lage waren, sowohl Kaninchen- als auch Schaferythrozyten zu agglutinieren, wobei Unterschiede in der Intensität festgestellt werden konnten. Bei zwei (2,5 %) Kulturen konnte bei vorhandener, jedoch schwach ausgeprägter Fähigkeit zur Agglutination von Kaninchenerythrozyten keine Agglutination von Schaferythrozyten nachgewiesen werden. Die 40 (50,7 %) Kulturen der Betriebe IV, V, VI und VII wiesen keine hämagglutinierenden Eigenschaften auf. Als Positivkontrolle diente die B-Streptokokkenkultur 395/2. Die Referenzkultur G28 wurde als Negativkontrolle mitgeführt (Tab. 11).

**Tabelle 11:**

**Beziehung zwischen Herkunft, Typenantigenmuster und hämagglutinierenden Eigenschaften der 79 *S. agalactiae*-Kulturen und der Kontrollkulturen**

Betrieb	n	Typen- antigen- muster	Hämagglutination mit Erythrozyten von	
			Kaninchen	Schaf
<b>I</b>	8	NT / X	++ (8**)	+ (8)
<b>II</b>	12	NT / X	++ (10), + (2)	+ (10), - (2)
<b>III</b>	5 / 14*	Ia / X	++ (19)	+ (19)
<b>IV</b>	17 / 8 *	NT	- (25)	- (25)
<b>V</b>	6	III / Rib	- (6)	- (6)
<b>VI</b>	7	NT	- (7)	- (7)
<b>VII</b>	2	Ib / $\alpha\beta$	- (2)	- (2)
<b>395/2</b>		IV/X	++	+
<b>G28</b>		III/R	-	-

n = Anzahl der untersuchten Kulturen

\* = Anzahl der *S. agalactiae*-Kulturen bei erneuter Isolierung nach 8 Monaten

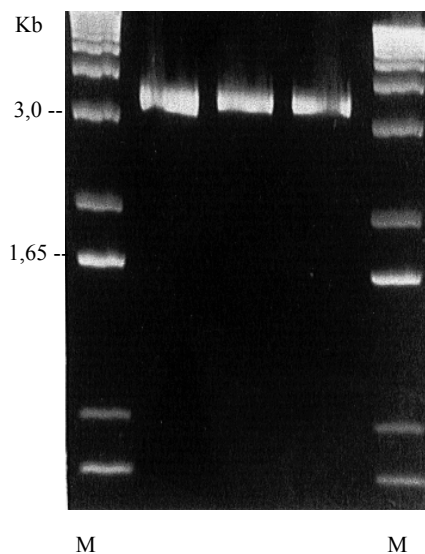
\*\* = Anzahl der Kulturen mit dem jeweiligen Merkmal

++ = deutliche Hämagglutination

+ = schwache Hämagglutination

- = keine Hämagglutination

Mit Hilfe des nach 3.5.6.1 durchgeführten Dekapsulationstests konnte bei allen 79 untersuchten *S. agalactiae*-Kulturen das Enzym Hyaluronidase nachgewiesen werden, das heißt alle Isolate führten zu einer Umwandlung der mukoid wachsenden Kolonien der *S. equi* subsp. *zooepidemicus*-Kultur W60 in nicht mukoid wachsende Kolonien. Für den PCR-vermittelten Nachweis des Gens *hylB* (3.5.6.2), welches das Enzym Hyaluronidase kodiert, wurden von den 79 *S. agalactiae*-Kulturen 18 Vertreter ausgewählt. Bei allen 18 Isolaten ergab die PCR-Analyse ein 3,3 Kilobasenpaar (Kb) großes Amplikon (Abb. 9). Bei dem PCR-vermittelten Nachweis des Insertionselementes IS *I548* (3.5.6.3) erwiesen sich alle 18 ausgewählten Kulturen als negativ. Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 zusammengefasst.



**Abb. 9:** Typisches Amplikon des Hyaluronidase-Gens *hylB* von *S. agalactiae* mit einer Größe von 3,3 Kb unter Verwendung der Oligonukleotidprimer Hyl 7 und Hyl 2, M = Marker (1 Kb Molecular Ruler/EZ Load, Bio-Rad).

Tabelle 12:

Nachweis des Enzyms Hyaluronidase bzw. PCR-Analyse des *hylB*-Gens und des Insertionselementes 1548 der 79 *S. agalactiae*-Kulturen

Betrieb	n	Dekapsulations- test	PCR-Analyse	
			<i>hylB</i> -Gen (3,3 Kb)	Insertionselement 1548 (0,98 Kb)
I	8	+	+(3**)	-(3)
II	12	+	+(3)	-(3)
III	5 / 14*	+	+(2)	-(2)
IV	17 / 8 *	+	+(2)	-(2)
V	6	+	+(6)	-(6)
VI	7	+	+(1)	-(1)
VII	2	+	+(1)	-(1)

n = Anzahl der Kulturen innerhalb eines Betriebes

\* = Anzahl der *S. agalactiae*-Kulturen bei erneuter Isolierung nach 8 Monaten

\*\* = Anzahl der untersuchten Kulturen

+

- = fehlende PCR-Reaktion

Bei der Untersuchung der Empfindlichkeit der Kulturen gegenüber zwölf ausgewählten Antibiotika erwiesen sich alle *S. agalactiae*-Isolate als empfindlich gegen Penicillin G, Oxacillin, Bacitracin, Erythromycin, Clindamycin und Cefotaxim. Die Empfindlichkeit gegenüber den Antibiotika Tetracyclin, Minocyclin und Gentamicin war variabel. Gegenüber Polymyxin B, Colistin und Sulphamethoxazol / Trimethoprim erwiesen sich alle Kulturen als resistent. Eine Tetracyclin-Resistenz trat immer gemeinsam mit einer Resistenz gegenüber Minocyclin auf. Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13:

Nachweis der Antibiotikaempfindlichkeit der 79 *S. agalactiae*-Kulturen

Betrieb	n	Penicillin G, Oxacillin, Bactracin, Erythromycin, Clindamycin, Cefotaxim	Polymyxin B, Colistin, Sulphamethoxazol / Trimethoprim	Tetracyclin	Minocyclin	Gentamicin
I	8	E	R	E	E	R
II	12			E	E	I (10**), R (2)
III	5 / 14*			E	E	R
IV	17 / 8 *			E	E	R
V	6			R	R	R
VI	7			R	R	R
VII	2			E	E	R

E = empfindlich

I = intermediär

R = resistent

n = Anzahl der untersuchten Kulturen

\* = Anzahl der *S. agalactiae*-Kulturen bei erneuter Isolierung nach 8 Monaten

\*\* = Anzahl der Kulturen mit dem jeweiligen Merkmal



Nach dem Verdau mit der Restriktionsendonuklease *Sma*I (3.6.2) und anschließender Auftrennung der Fragmente mittels Pulsfeldgelelektrophorese (3.6.3) konnten innerhalb der 73 *S. agalactiae*-Isolate, die sich mit *Sma*I schneiden ließen, zehn Fragmentmuster festgestellt werden (Tab. 14). Bei der Makrorestriktionsanalyse der sechs Kulturen des Betriebes V erwies sich die Endonuklease *Sma*I als ungeeignet. Mit diesem Enzym konnte kein Restriktionsmuster erstellt werden.

**Tabelle 14:**

**Übersicht über die nachgewiesenen Fragmentmuster innerhalb der 79 *S. agalactiae*-Kulturen nach Verdau mit der Restriktionsendonuklease *Sma*I.**

Betrieb	n	Anzahl der Fragmentmuster	Anzahl der unterschiedlichen Fragmente	Bezeichnung der Fragmentmuster
<b>I</b>	8	2	2	I <sub>Sma</sub> I A (5**), I <sub>Sma</sub> I B (3)
<b>II</b>	12	2	3	II <sub>Sma</sub> I A (10), II <sub>Sma</sub> I B (2)
<b>III</b>	5 / 14*	2	1	III <sub>Sma</sub> I A (18), III <sub>Sma</sub> I B (1)
<b>IV</b>	17 / 8 *	2	1	IV <sub>Sma</sub> I A (17), IV <sub>Sma</sub> I B (8)
<b>V</b>	6	∅	∅	∅
<b>VI</b>	7	1	-	VI <sub>Sma</sub> I (7)
<b>VII</b>	2	1	-	VII <sub>Sma</sub> I (2)

n = Anzahl der untersuchten Kulturen

\* = Anzahl der *S. agalactiae*-Kulturen bei erneuter Isolierung nach 8 Monaten

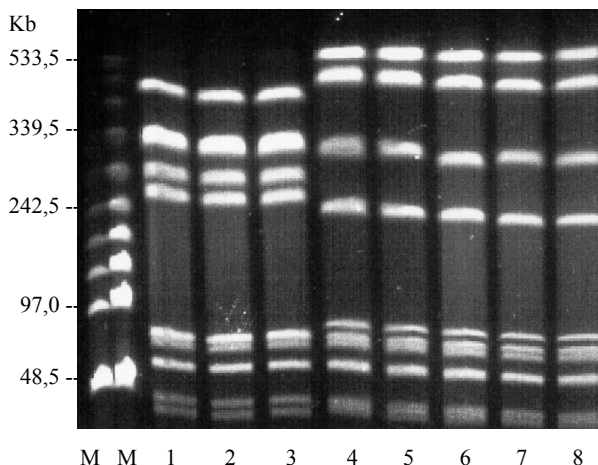
\*\* = Anzahl der Kulturen mit identischem Fragmentmuster

∅ = kein Restriktionsmuster erstellbar

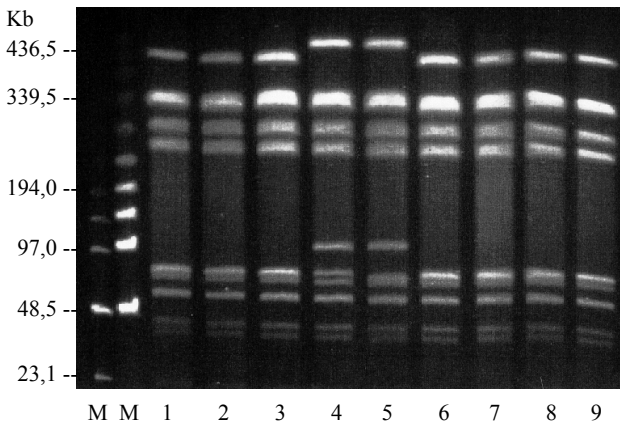
- = keine Unterschiede im Restriktionsmuster

Innerhalb der *Sma*I-Restriktionsmuster konnten acht bis 15 Fragmente nachgewiesen werden, deren Größe zwischen 533,0 Kb und 23,1 Kb lag. Kleinere Fragmente waren auch auf Aufnahmen vor Ablauf des Elektrophoreseprogrammes nicht festzustellen. Die Anzahl der Fragmente innerhalb der Muster eines Betriebes variierte

um maximal drei Banden. Die Mehrheit der nachweisbaren Fragmente war kleiner als 97,0 Kb. Die Muster der einzelnen Betriebe unterschieden sich in den Fragmenten, die größer als 97,0 Kb waren, deutlicher voneinander als in den kleineren Fragmenten (Abb. 10). In Abbildung 11 sind die Restriktionsmuster von neun der zwölf Stämme aus Betrieb II dargestellt.



**Abb. 10: PFGE-Restriktionsmuster der chromosomalen DNA von 8 *S. agalactiae*-Kulturen nach Verdau mit dem Restriktionsenzym *SmaI*; (1-3: Isolate aus Betrieb II, Fragmentmuster II<sub>SmaI</sub>A; 4-8: Isolate aus Betrieb III, Fragmentmuster III<sub>SmaI</sub>A); M = Längenstandard (Low Range PFG Marker, 0,1 – 200 Kb, Lambda Ladder PFG Marker, 50 – 1000 Kb, BioLabs).**



**Abb. 11:** PFGE-Restriktionsmuster der chromosomalen DNA von 9 *S. agalactiae*-Kulturen aus Betrieb II nach Verdau mit dem Restriktionsenzym *Sma*I; (1, 2, 3, 6, 7, 8, 9: Fragmentmuster II<sub>*Sma*I A</sub>; 4, 5: Fragmentmuster II<sub>*Sma*I B</sub>); M = siehe Abb. 10.

Mit der Endonuklease *Apa*I konnten zwölf Restriktionsmuster nachgewiesen werden (Tab. 15), wobei sich die chromosomale DNA der Isolate des Betriebes V wiederum nicht schneiden und analysieren ließ. Die Restriktionsmuster wiesen elf bis 20 Fragmente auf, deren Größe zwischen 339,5 Kb und 23,1 Kb lag. Hier konnten ebenfalls keine kleineren Fragmente festgestellt werden. Die Anzahl der Fragmente innerhalb der Muster eines Betriebes variierte um maximal drei. Die Mehrheit der nachweisbaren Fragmente war kleiner als 97,0 Kb. In Abbildung 12 sind die Restriktionsmuster von vier *S. agalactiae*-Stämmen aus Betrieb II dargestellt. Die Abbildung 13 zeigt die Fragmentmuster von neun von 17 Erstisolaten des Betriebes IV. Abbildung 14 zeigt das Restriktionsmuster von sechs Kulturen des Betriebes VI.

Tabelle 15:

Übersicht über die nachgewiesenen Fragmentmuster innerhalb der 79 *S. agalactiae*-Kulturen nach Verdau mit der Restriktionsendonuklease *Apa*I.

Betrieb	n	Anzahl der Fragmentmuster	Anzahl der unterschiedlichen Fragmente	Bezeichnung der Fragmentmuster
I	8	3	1-2	I <sub>Apa</sub> I A (2**), I <sub>Apa</sub> I B (3), I <sub>Apa</sub> I C (3)
II	12	3	1-3	II <sub>Apa</sub> I A (7), II <sub>Apa</sub> I B (3), II <sub>Apa</sub> I C (2)
III	5 / 14*	2	1	III <sub>Apa</sub> I A (11), III <sub>Apa</sub> I B (8)
IV	17 / 8 *	2	1	IV <sub>Apa</sub> I A (23), IV <sub>Apa</sub> I B (2)
V	6	Ø	Ø	Ø
VI	7	1	-	VI <sub>Apa</sub> I (7)
VII	2	1	-	VII <sub>Apa</sub> I (2)

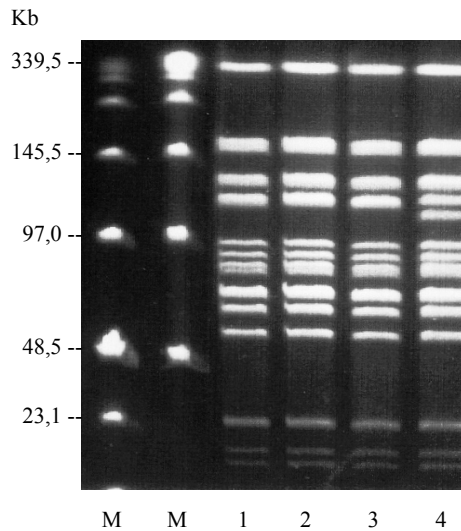
n = Anzahl der untersuchten Kulturen

\* = Anzahl der *S. agalactiae*-Kulturen bei erneuter Isolierung nach 8 Monaten

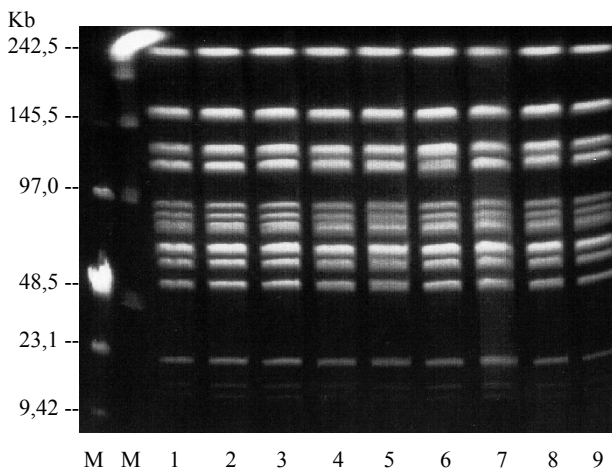
\*\* = Anzahl der Kulturen mit identischem Fragmentmuster

Ø = kein Restriktionsmuster erstellbar

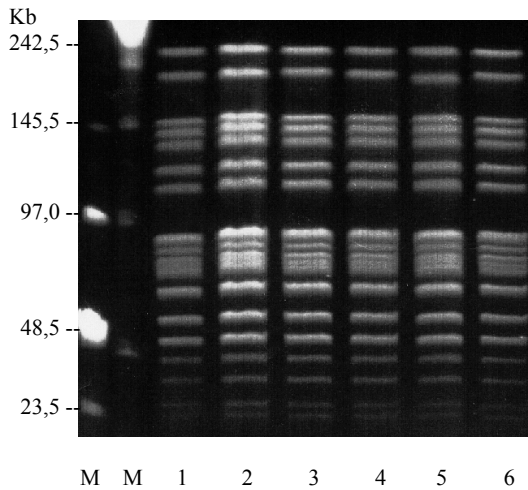
- = keine Unterschiede im Restriktionsmuster



**Abb. 12:** PFGE-Restriktionsmuster der chromosomalen DNA von 4 *S. agalactiae*-Kulturen aus Betrieb II nach Verdau mit dem Restriktionsenzym *Apa*I (1, 2, 3: Fragmentmuster II<sub>*Apa*I</sub>A; 4: Fragmentmuster II<sub>*Apa*I</sub>B); M = siehe Abb. 10.

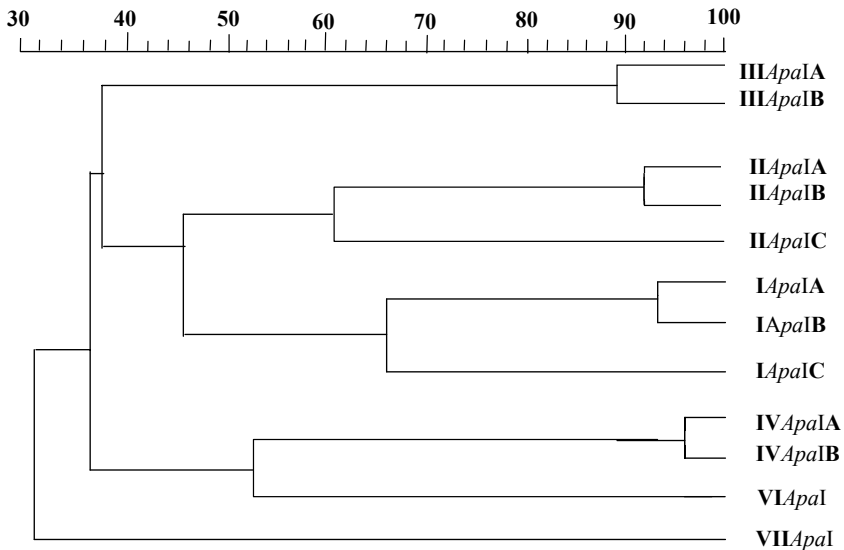


**Abb. 13:** PFGE-Restriktionsmuster der chromosomalen DNA von 9 *S. agalactiae*-Kulturen aus Betrieb IV nach Verdau mit dem Restriktionsenzym *Apa*I (Fragmentmuster IV<sub>*Apa*I</sub>A); M = siehe Abb. 10.



**Abb. 14:** PFGE-Restriktionsmuster der chromosomalen DNA von 6 *S. agalactiae*-Kulturen aus Betrieb VI (Fragmentmuster VI<sub>Apal</sub>) nach Verdau mit dem Restriktionsenzym *Apal*; M = siehe Abb. 10.

Um mögliche verwandtschaftliche Beziehungen der Kulturen der einzelnen Betriebe untereinander feststellen zu können, wurden die *ApaI*-DNA-„fingerprints“ von sechs der sieben Betriebe vergleichend durch Dendrogrammanalyse bewertet (Abb. 15). Dabei war zu erkennen, dass die Kulturen innerhalb der einzelnen Betriebe sehr eng miteinander verwandt waren. Zwischen den Kulturen der verschiedenen Betriebe bestand jedoch kein verwandtschaftlicher Zusammenhang.



**Abb. 15:** Dendrogrammanalyse der 12 *ApaI*-Klone der untersuchten *S. agalactiae*-Kulturen.

Unter Verwendung des Restriktionsenzym *SalI* konnte bei den sechs Kulturen des Betriebes V ein interpretierbarer DNA-„fingerprint“ erzielt werden. Alle sechs Isolate zeigten ein identisches Restriktionsmuster. Für die anderen untersuchten *S. agalactiae*-Kulturen erwies sich die Endonuklease *SalI* als ungeeignet, da bis zu 30 Fragmente entstanden.



In Tabelle 16 sind nochmals einige phänotypische Merkmale sowie die jeweiligen *ApaI*-Restriktionsmuster der untersuchten *S. agalactiae*-Kulturen zusammenfassend dargestellt.

**Tabelle 16: Einige phänotypische Eigenschaften der 79 *S. agalactiae*-Kulturen und nachgewiesene *ApaI*-Restriktionsmuster.**

Betrieb	n	Serotyp	Häm- agglu- tination	Pigment- bildung	Tetracyclin- Resistenz	<i>ApaI</i> - Fragment- muster
I	8	NT / X	+	+	-	I <sub>ApaI</sub> A (2**), I <sub>ApaI</sub> B (3), I <sub>ApaI</sub> C (3)
II	12	NT / X	+	+ bis ++	-	II <sub>ApaI</sub> A (7), II <sub>ApaI</sub> B (3), II <sub>ApaI</sub> C (2)
III	5 / 14*	Ia / X	+	+++	-	III <sub>ApaI</sub> A (11), III <sub>ApaI</sub> B (8)
IV	17 / 8 *	NT	-	-	-	IV <sub>ApaI</sub> A (23), IV <sub>ApaI</sub> B (2)
V	6	III / Rib	-	+	+	∅
VI	7	NT	-	+	+	VI <sub>ApaI</sub> (7)
VII	2	Ib / cαβ	-	+++	-	VII <sub>ApaI</sub> (2)

n = Anzahl der untersuchten *S. agalactiae*-Kulturen

\* = Anzahl der *S. agalactiae*-Kulturen bei erneuter Isolierung nach 8 Monaten

\*\* = Anzahl der *S. agalactiae*-Kulturen mit dem jeweiligen Fragmentmuster

+ = Kulturen weisen das Merkmal auf

- = Kulturen sind keine Merkmalsträger

∅ = kein Restriktionsmuster erstellbar

## 5. Diskussion

Alle 79 Streptokokkenkulturen der vorliegenden Arbeit, isoliert von subklinischen Mastitiden von 54 Kühen aus sieben hessischen Milcherzeugerbetrieben, konnten aufgrund kultureller, biochemischer, serologischer und molekularer Untersuchungen als *Streptococcus agalactiae* identifiziert und der serologischen Gruppe B zugeordnet werden.

ROSS (1984) beschrieb *S. agalactiae* als grampositive, unbewegliche Kokken, die Kolonien mit einem Durchmesser von ca. 1 mm bildeten. In den vorliegenden Untersuchungen wiesen die Kolonien der überwiegenden Zahl der *S. agalactiae*-Kulturen nach Anzüchtung für 24 h bei 37 °C auf Columbia-Agar unter Zusatz von 5 % defibrinierten Schafblutes eine Größe zwischen 0,5 und 2 mm auf. Die Kolonien der beiden Isolate des Betriebes VII waren größer als 2 mm. Der im Vergleich zu den Angaben von ROSS (1984) etwas größere Koloniedurchmesser ist möglicherweise auf verbesserte Wachstumsbedingungen durch den Einsatz von Columbia-Agar unter Zugabe von Schafblut zurückzuführen.

*S. agalactiae* wächst auf Schafblutagarplatten unter Ausbildung einer zumeist schwachen  $\beta$ -Hämolyszone oder weist andernfalls eine  $\alpha$ - oder  $\gamma$ -Hämolys auf, während andere veterinär- oder humanmedizinisch bedeutsame Streptokokkenspezies im allgemeinen eine deutliche  $\beta$ -Hämolys zeigen (HAHN, 1981; SELBITZ, 1992; LÄMMLER und HAHN, 1994). TODD (1934) beschrieb bei B-Streptokokken ein Hämolysin, das von der überwiegenden Zahl dieser Streptokokkenspezies gebildet wurde. Dieses Hämolysin konnte erstmals von MARCHLEWICZ und DUNCAN (1980) isoliert und charakterisiert werden. Die Autoren berichteten von Ähnlichkeiten zwischen dem Hämolysin der B-Streptokokken und dem Streptolysin S von Streptokokken der serologischen Gruppe A. ROSS (1984) stellte fest, dass B-Streptokokken humanen Ursprungs auf Schafblutagar häufiger eine  $\beta$ -Hämolys aufwiesen, während *S. agalactiae*-Kolonien, isoliert von Kühen, eher eine  $\alpha$ - oder  $\gamma$ -Hämolys zeigten. Ein vergleichbarer Zusammenhang konnte bei den Kulturen der vorliegenden Arbeit nicht festgestellt werden. Die überwiegende Zahl der untersuchten Kulturen (84,8 %) aus sechs von sieben Betrieben wuchs nach

Anzüchtung auf Columbia-Schafblutagarplatten unter Ausbildung einer schmalen Zone vollständiger ( $\beta$ -) Hämolyse. Die verbleibenden Isolate (15,2 %), welche sämtlich aus dem Betrieb II stammten, zeigten eine relativ breite  $\beta$ -Hämolysezone. Keine der untersuchten Kulturen der vorliegenden Arbeit wies eine  $\alpha$ - oder  $\gamma$ -Hämolyse auf. Während Hämolsine anderer grampositiver Kokken bedeutende Virulenzfaktoren darstellen, konnten WEISER und RUBENS (1987) keine Unterschiede in der Pathogenität zwischen  $\beta$ -hämolisierenden B-Streptokokkenkulturen und ihren hämolsinfreien Mutanten erkennen. WENNERSTRÖM et al. (1985) sowie TAPSALL und PHILLIPS (1987) stellten dagegen zytolytische Aktivitäten des Hämolsins der B-Streptokokken fest. NIZET et al. (1996) berichteten, dass gereinigtes Hämolsin Enzyme aus Makrophagen freisetzt. Die Autoren vermuteten aufgrund der Beobachtung zytopathischer Effekte an Lungenepithelzellen, dass das Hämolsin zugleich auch ein Zytolysin sei. LÜTTICKEN et al. (1988) sowie CONRADS et al. (1991) isolierten die genetische Determinante des Hämolsins der B-Streptokokken, klonierten und sequenzierten das entsprechende Gen.

Ein weiteres Charakteristikum der B-Streptokokken ist die sogenannte CAMP-Reaktion. CHRISTIE et al. (1944) beschrieben erstmals dieses Phänomen einer synergistischen Hämolyse von Schaferythrozyten, welche durch ein extrazelluläres Protein von Streptokokken der serologischen Gruppe B in der unvollständigen Hämolysezone des  $\beta$ -Toxins, einer Sphingomyelinase von *Staphylococcus aureus*, verursacht wird. Das nach den Anfangsbuchstaben seiner Erstbeschreiber als CAMP-Faktor bezeichnete Protein der B-Streptokokken bindet an ein Ceramid-Phosphat der Zellwand der Erythrozyten, führt dadurch zu einer Disorganisation der Lipiddoppelschicht und schließlich zur Hämolyse (BERNHEIMER et al., 1979). RÜHLMANN et al. (1989) bezeichneten den CAMP-Faktor aufgrund einer Wechselwirkung des Proteins mit Immunglobulinen als Protein B. BERNHEIMER et al. (1979) beschrieben das CAMP-Protein als ein thermostabiles Protein mit einem Molekulargewicht von 23.500 Da und einem isoelektrischen Punkt bei pH 8,3, während JÜRGENS et al. (1985) das CAMP-Protein als ein Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 25.000 Da und einem isoelektrischen Punkt bei pH 8,9 charakterisierten. Dieses Protein wurde lange Zeit für hochspezifisch für B-Streptokokken gehalten und somit allgemein zur vorläufigen Identifizierung dieser

Spezies genutzt (KEXEL, 1965; BROWN et al., 1974). Alle 79 *S. agalactiae*-Kulturen der vorliegenden Untersuchung zeigten sowohl auf Schaf- als auch auf Rinderblutagarplatten eine positive CAMP-Reaktion. Über vergleichbare Ergebnisse berichteten zahlreiche Autoren (SKALKA und SMOLA, 1981; LÄMMLER et al., 1984; FINCH und MARTIN, 1984; LÄMMLER und BLOBEL, 1987a, 1987b; DEVRIESE, 1991; WIBAWAN, 1993; LÄMMLER und HAHN, 1994). Einige Autoren beschrieben allerdings auch B-Streptokokken mit fehlender CAMP-Reaktion (MURPHY et al., 1952; MÜLLER, 1967; THAL und OBIGER, 1969; HOFFMANN, 1972; WAITKINS, 1980; PODBIELSKI et al., 1994; HASSAN et al., 2000) sowie positive CAMP-Reaktionen bei einer Reihe von gramnegativen (FRASER, 1962; KILLIAN, 1976; FIGURA und GUGLIELMETTI, 1987; KÖHLER, 1988; FREY et al., 1989) und weiteren grampositiven Bakterien (FRASER, 1961; HEESCHEN et al., 1967; THAL und OBIGER, 1969; SKALKA und SMOLA, 1981; ROCOURT und GRIMONT, 1983; HÉBERT und HANCOCK, 1985; WATTS und OWENS, 1987; LÄMMLER et al., 1987a; LÄMMLER und BLOBEL, 1987b; GÜRTÜRK und LÄMMLER, 1990; LOPES et al., 1995; LÄMMLER et al., 1998b; HASSAN et al., 2000). Trotz dieser Berichte hat sich nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit die CAMP-Reaktion als zuverlässige Methode zur vorläufigen Identifizierung von Streptokokken der Serogruppe B bewährt.

Die 79 Kulturen der vorliegenden Untersuchungen ließen sich des weiteren anhand ihrer biochemischen Eigenschaften als *S. agalactiae* identifizieren. Alle Isolate waren in der Lage, die Kohlenhydrate Glucose, Lactose, Maltose und Saccharose abzubauen. Arabinose, Inulin, Mannit und Sorbit konnten dagegen nicht umgesetzt werden. Diese Eigenschaften entsprachen im wesentlichen den Angaben von BRIDGE und SNEATH (1983), ROTTA (1986), LÄMMLER und BLOBEL (1987a), WIBAWAN (1993) sowie LÄMMLER und HAHN (1994). Im Gegensatz zu den Ergebnissen von ROSS (1984) sowie FINCH und MARTIN (1984) waren 44,3 % der *S. agalactiae*-Kulturen der vorliegenden Arbeit in der Lage, Salicin zu fermentieren. Eine Variabilität von B-Streptokokken im Salicinabbau wurde bereits von VAN DEN HEEVER und ERASMUS (1980), HAHN (1981), HARDIE (1986), WIBAWAN (1993), MOSABI et al. (1997) sowie YILDIRIM (2002) beschrieben. In den vorliegenden Untersuchungen konnten 29,1 % der Isolate Trehalose umsetzen. VAN

DEN HEEVER und ERASMUS (1980) bzw. HARDIE (1986) wiesen bei 79 % bzw. 100 % der B-Streptokokken boviner Herkunft einen Abbau dieses Kohlenhydrats nach. Alle 79 Kulturen der vorliegenden Arbeit zeichneten sich außerdem durch die Hydrolyse von Natrium-Hippurat und die fehlende Spaltung von Eskulin aus. Dies waren nach FINCH und MARTIN (1984), HARDIE (1986), LÄMMLER und BLOBEL (1987a), WIBAWAN (1993) sowie LÄMMLER und HAHN (1994) typische Eigenschaften von Streptokokken der Serogruppe B. Die *S. agalactiae*-Isolate innerhalb der einzelnen Milcherzeugerbetriebe wiesen identische biochemische Eigenschaften auf. Dies deutete bereits auf verwandtschaftliche Beziehungen der Kulturen in den jeweiligen Betrieben hin.

Im Jahr 1925 gelang es LANCEFIELD (1925a, 1925b), aus Zellwandextrakten von *S. viridans* ein hitzestabiles gruppenspezifisches Kohlenhydrat zu gewinnen, welches als C-Polysaccharidantigen bezeichnet wurde. Dieses sogenannte Lancefield'sche Antigen konnte in den folgenden Jahren auch bei anderen Streptokokkenspezies nachgewiesen und isoliert werden. Es bildete die Grundlage der serologische Gruppeneinteilung der Streptokokken nach Lancefield. *S. agalactiae* wird aufgrund dieses gemeinsamen Gruppenpolysaccharidantigens der serologischen Lancefield-Gruppe B zugeordnet (LANCEFIELD, 1933). Bei dem gruppenspezifischen Antigen der B-Streptokokken handelt es sich nach CURTIS und KRAUSE (1964), PRITCHARD et al. (1984) sowie MICHON et al. (1987) um ein Polysaccharid, bestehend aus L-Rhamnose (50,5%) als serologisch determinierende Substanz, aus Galactose (15%), N-Acetylglucosamin (12%) und Glucitolphosphat. Verfahren der Antigenextraktion und Methoden zum Nachweis der Gruppenantigene wurden von LANCEFIELD (1933), FULLER (1938), RANTZ und RANDALL (1955), SEELEMANN und OBIGER (1958), FACKLAM (1976), EL KOHYL et al. (1978), LÖGERING (1981), LÄMMLER et al. (1986), LOTZ-NOLAN et al. (1989), LÄMMLER und WIBAWAN (1990) sowie LÄMMLER (1995) beschrieben. In der vorliegenden Untersuchung erfolgte der Nachweis des Gruppenpolysaccharidantigens bei allen 79 Kulturen mit Gruppe B-spezifischem Antiserum in der Doppelimmundiffusion nach OUCHTERLONY (1949) sowie durch Staphylokokken-Koagulation nach EDWARDS und LARSON (1974) bzw. LÄMMLER und HAHN

(1994). Kreuzreaktionen mit Gruppe A-, C-, G- und L-spezifischen Antiseren konnten nicht festgestellt werden.

Eine schnelle und sichere Diagnosestellung bei einer Erkrankung und die Identifizierung des ursächlichen Erregers bildet die Grundlage für eine effektive Behandlung und rasche Heilung des betroffenen Organismus. Für die Identifizierung von Streptokokken der serologischen Gruppe B mit konventionellen Verfahren werden ca. 36 bis 48 Stunden benötigt. Durch den Einsatz molekularer Untersuchungsverfahren wird der Zeitraum bis zur Identifizierung deutlich verkürzt. REISCHL und WOLF (1998) gaben einen Überblick über die Nutzung einiger molekularer Methoden bei der Untersuchung von Infektionskrankheiten. Eine der am häufigsten angewendeten Methoden ist die Polymerasekettenreaktion (PCR), welche 1985 von Kary B. Mullis in Kalifornien entwickelt wurde (SAIKI et al., 1985; MULLIS und FALOONA, 1987; SAIKI et al., 1988; MULLIS, 1990a, 1990b), wofür er 1993 den Nobelpreis für Chemie erhielt. Bei der PCR handelt es sich um eine *in vitro*-Technik, bei der es zu einer gezielten Vervielfältigung von DNA-Abschnitten kommt, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen eingerahmt werden. Zur Reproduktion des gewählten Zielsegmentes der DNA oder RNA werden spezielle Oligonukleotidprimer benötigt. Diese sind kurze, einzelsträngige DNA-Moleküle, die komplementär zu den Enden der definierten Sequenz der DNA-Matrize, auch als „template“ bezeichnet, sind. Die Amplifikationsreaktion läuft in drei Schritten während einer Reihe von Temperaturänderungen ab. Beim ersten Schritt kommt es bei hohen Temperaturen zur Denaturierung der DNA, so dass sich die Doppelstränge trennen. Daran schließt sich das "annealing", die Primeranlagerung an den komplementären DNA-Strang bei niedrigeren Temperaturen an. Den Abschluss des Reaktionszyklus bildet die Extension, d. h. die Synthese des 5'-3'-DNA-Stranges, beginnend vom 3'-Ende des Primers durch eine thermostabile *taq*-DNA-Polymerase in Gegenwart von Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) bei moderaten Temperaturen. Diese drei Schritte definieren einen PCR-Zyklus. Die PCR-Produkte, Amplikons genannt, enthalten an ihren Enden die Oligonukleotidsequenzen der Primer. Bei jedem neuen Vermehrungszyklus dienen auch die neusynthetisierten DNA-Stränge als Matrize und tragen dazu bei, dass die Konzentration der vervielfältigten Ziel-Sequenzen exponentiell ansteigt. Theoretisch kommt es dadurch zu einer Verdoppelung der Zielsequenzen nach

Abschluss eines jeden Zyklus, wodurch Millionen von Kopien der Ziel-DNA-Sequenz produziert werden. In der Praxis vermehren sich die gesuchten Sequenzen jedoch nicht beliebig lange exponentiell. In jedem Zyklus verhindern verschiedene Faktoren eine hundertprozentige Ausbeute, ein Effekt, der sich in späteren PCR-Zyklen noch verstärkt. Meist sind für die PCR-Reaktion die Enzymmenge und -aktivität als die limitierenden Faktoren verantwortlich. Mit zunehmender Konzentration der gewünschten Produkte vermindert auch deren Hybridisierung untereinander die Effektivität der Vervielfältigung, da diese Reaktion mit der Anlagerung der Primer konkurriert (REISCHL und WOLF, 1998).

Eine PCR-vermittelte Identifizierung einer Bakterienspezies ist durch molekulare Analysen bestimmter Abschnitte des bakteriellen Genoms möglich. Ein besonders geeignetes Ziel für diese Untersuchungen ist nach BENTLEY et al. (1991) die ribosomale RNA, welche sowohl einen strukturellen als auch einen funktionellen Bestandteil des Ribosoms darstellt, der durch Transkription von DNA-Sequenzen entsteht. Für eine präzise PCR-vermittelte Identifizierung von *S. agalactiae* durch molekulare Analysen eignet sich in erster Linie die 16S ribosomale RNA (BENTLEY und LEIGH, 1995). Die 16S rRNA stellt einen bedeutenden Bestandteil der ribosomalen RNA dar und enthält konstante sowie variable Abschnitte. Dies ermöglicht für PCR-Analysen des Gens der 16S rRNA zwei unterschiedliche Strategien. Zum einen werden sogenannte universelle Primer zum Auffinden der konservierten Genabschnitte genutzt. Diese Methode ermöglicht es, auch dazwischenliegende variable Regionen zu amplifizieren, welche anschließend durch Restriktionsverdau der Amplifikate identifiziert werden können (ABDULMAWJOOD et al., 1998; LÄMMLER et al., 1998c). Die zweite Strategie besteht in der Erstellung von spezifischen Primern für diese variablen Bereiche, welche zwar im Laufe der Evolution stets Mutationen unterworfen waren, dennoch in ihrer Variabilität ausreichend stabil zu sein scheinen, um eine Untersuchung auf phylogenetische Verwandtschaften hin zu erlauben (BENTLEY und LEIGH, 1995). Eine positive PCR-Reaktion unter Verwendung dieser spezifischen Oligonukleotidprimer, d. h. die Amplifizierung eines Genabschnitts definierter Größe, ermöglicht somit eine Identifizierung der jeweiligen Bakterienspezies. So stellt beispielsweise die sogenannte V2-Region der 16S rDNA-Sequenz ein einzigartiges Kennzeichen für jede Streptokokkenspezies dar und bietet

Informationen über verwandtschaftliche Beziehungen zwischen den einzelnen Spezies. In Untersuchungen von BENTLEY und LEIGH (1995) erwies sich diese Region bei 31 Streptokokkenspezies, darunter auch *S. agalactiae*, als spezifisch und wurde seitdem zur Identifizierung verschiedenster Streptokokkenarten genutzt (LÄMMLER et al., 1998c; ABDULMAWJOOD und LÄMMLER, 1999). Diese Möglichkeit zur Identifizierung von B-Streptokokken wurde u. a. von AHMET et al. (1999), FINK et al. (2000), HASSAN et al. (2001) sowie ESTUNINGSIH et al. (2002) angewendet.

In der vorliegenden Arbeit wurden die von ABDULMAWJOOD und LÄMMLER (1999) vorgestellten und bereits von HASSAN et al. (2000) zur PCR-vermittelten Identifizierung von B-Streptokokken verwendeten *S. agalactiae*-16S rDNA-spezifischen Oligonukleotidprimer, von denen einer im Bereich der *S. agalactiae*-spezifischen V2-Region seine Ansatzstellen hatte, gewählt. Bei allen 79 untersuchten B-Streptokokkenkulturen entstand ein Amplikon mit einer einheitlichen Größe von 1250 Basenpaaren (Bp). Dies ermöglichte eine molekulare Identifizierung dieser Spezies und deutete auf einheitliche Basensequenzen in diesem Bereich des *S. agalactiae*-Genoms hin.

Als weitere Möglichkeit zur molekularen Identifizierung von *S. agalactiae* mittels PCR erwies sich ein Bereich der rDNA zwischen dem 16S rRNA- und dem 23S rRNA-Gen, welcher als 16S-23S rDNA „intergenic spacer“-Region bezeichnet wird (BARRY et al., 1991; JENSEN et al., 1993; GÜRTLER und STANISICH, 1996). Dabei handelt es sich um eine Region, die unter minimalem Selektionsdruck zu stehen scheint und nützliche taxonomische Informationen enthält (BARRY et al., 1991). Die DNA der „intergenic spacer“-Region variiert innerhalb nahe verwandter Bakterienspezies in ihrer Größe und Sequenz weit signifikanter als das angrenzende 16S rRNA- bzw. das 23S rRNA-Gen (FORSMAN et al., 1997). Diese Variationen ermöglichen eine Differenzierung von Streptokokken innerhalb der Gattung, Art oder auch auf Stammniveau (WHILEY et al., 1995; CHANTER et al., 1997; BERRIDGE et al., 1998; MOSCHETTI et al., 1998; GARCÍA-MARTÍNEZ et al., 1999). So konnten FORSMAN et al. (1997) beispielsweise sieben Staphylokokken- und drei Streptokokkenspezies, darunter auch *S. agalactiae*, durch PCR-Analysen der 16S-23S rDNA „intergenic spacer“-Region identifizieren. BERRIDGE et al. (2001) bewiesen durch PCR-Analysen der 16S-23S rDNA „intergenic spacer“-Region von *Streptococcus difficile*, dass es sich bei dieser



Streptokokkenspezies ebenso um Streptokokken der serologischen Gruppe B mit dem Serotyp Ib handelte. PHUEKTES et al. (2001) konnten durch Multiplex-PCR, in der mehrere speziesspezifische Primerpaare zur Amplifikation der 16S-23S rDNA „intergenic spacer“-Region eingesetzt wurden, verschiedene mastitisverursachende Staphylokokken- und Streptokokkenspezies, darunter auch *S. agalactiae*, simultan nachweisen.

In den vorliegenden Untersuchungen ergab die PCR-Analyse der 16S-23S rDNA „intergenic spacer“-Region unter Verwendung der von CHANTER et al. (1997) beschriebenen Oligonukleotidprimer bei allen 79 *S. agalactiae*-Isolaten ein typisches Amplikon mit einer einheitlichen Größe von 650 Bp. Unter Verwendung der von FORSMAN et al. (1997) beschriebenen Oligonukleotidprimer konnte bei ebenfalls allen 79 *S. agalactiae*-Isolaten ein Amplikon mit einer einheitlichen Größe von 290 Bp nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse und vergleichbare Untersuchungen von FINK et al. (2000), TILSALA-TIMISJÄRVI et al. (2000), HASSAN et al. (2001), ESTUNINGSIH et al. (2002) sowie YILDIRIM (2002) deuteten darauf hin, dass in der „intergenic spacer“-Region von B-Streptokokken vom Rind und auch unterschiedlicher Herkunft keine Sequenzunterschiede zu bestehen scheinen. Dieser Genabschnitt bzw. die gewählten Oligonukleotidprimer eigneten sich somit ebenso zum PCR-vermittelten Nachweis dieser Spezies.

Eine dritte Zielregion für die PCR-vermittelte Identifizierung der B-Streptokokken der vorliegenden Arbeit stellte das den CAMP-Faktor von B-Streptokokken kodierende Gen *cfb* dar. SCHNEEWIND et al. (1988) gelang die Klonierung dieser genetischen Determinante des CAMP-Faktors in *Escherichia coli*. Das CAMP-Faktor-Gen von *S. agalactiae* wurde von PODBIELSKI et al. (1994) sequenziert. Auf dieser Grundlage konnten speziesspezifische Primer konzipiert werden. In den vorliegenden Untersuchungen zeigten alle 79 *S. agalactiae*-Kulturen unter Verwendung der von PODBIELSKI et al. (1994) beschriebenen *cfb*-spezifischen Primer eine positive PCR-Reaktion. Das Amplikon wies eine einheitliche Größe von 1020 Bp auf. Dies entsprach der erwarteten Größe des *cfb*-Genamplikons von 1026 Bp. Vergleichbare PCR-Ergebnisse bei der Amplifizierung des *cfb*-Gens von B-Streptokokken erzielten FINK et al. (2000), HASSAN et al. (2000), ESTUNINGSIH et al. (2002) sowie YILDIRIM

(2002). Zur Identifizierung von B-Streptokokken auf der Grundlage des Nachweises des CAMP-Faktor-Gens *cfb* entwickelten KE et al. (2000) eine „real time“-PCR.

Die beschriebenen Abschnitte des 16S rRNA-Gens und der 16S-23S rDNA „intergenic spacer“-Region sowie des CAMP-Faktor-Gens *cfb* erwiesen sich für die PCR-vermittelte Identifizierung der 79 untersuchten *S. agalactiae*-Kulturen als hochspezifisch und zeigten hinsichtlich der Primeranlagerungsstellen und der Größe der Amplifikate keine Genpolymorphismen.

Seit LANCEFIELD (1934) entdeckte, dass *S. agalactiae*-Kulturen aufgrund von Polysacchariden auf ihrer Zelloberfläche in verschiedene Serotypen eingeteilt werden konnten, stellte die sogenannte Serotypisierung das wichtigste Instrument der epidemiologischen Erforschung von Infektionsausbrüchen mit B-Streptokokken dar. Eine weitere Unterteilung der Serotypen in Subtypen, v. a. bei Isolaten von Milchkühen, war durch den Nachweis von Proteinantigenen möglich (PATTISON et al., 1955a). Bisher konnten die Polysaccharidantigene Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII und VIII sowie die Proteinantigene R, Rib, X, c und das „R-associated antigen“ (Ra) nachgewiesen werden (LANCEFIELD, 1938a; PATTISON et al., 1955b; WILKINSON und EAGON, 1971; WILKINSON, 1972; WILKINSON, 1977; PERCH et al., 1979; HENRICHSEN et al., 1984; JELINKOVA und MOTLOVA, 1985; MURAI et al., 1990; WIBAWAN und LÄMMLER, 1990a, 1991a; STÅLHAMMAR-CARLEMALM et al., 1993; von HUNOLSTEIN et al., 1993; KVAM et al., 1993; WAGNER et al., 1994; von HUNOLSTEIN et al., 1999). Einen zusammenfassenden Überblick über die neun Polysaccharidantigene boten HARRISON et al. (1999) und HICKMAN et al. (1999). Methoden zur Extraktion der Polysaccharide und Proteine von der Zelloberfläche der B-Streptokokken sowie zum Nachweis der entsprechenden Antigene wurden von LANCEFIELD (1938b), LANCEFIELD und FREIMER (1966), JELINKOVA und HEESCHEN (1969) sowie KIRKEGAARD und FIELD (1977) beschrieben. Ein gemeinsames Merkmal der Kapselpolysaccharide der B-Streptokokken ist ihre Natur eines Polymers mit einem hohen Molekulargewicht, bestehend aus einer sich wiederholenden Einheit aus Glucose, Galactose, N-Acetylglucosamin und N-Acetylneuraminsäure, letztere auch als Sialinsäure bezeichnet (JENNINGS et al., 1984; WESSELS et al., 1989; WESSELS, 1997). Trotz dieser strukturellen Verwandtschaft erwiesen sich die Kapselpolysaccharide als immunologisch verschieden. Der

Mechanismus der Immunantwort des betroffenen Wirtsorganismus gegen den Erreger basierte zum größten Teil auf der Wiedererkennung der Kapselantigene durch spezifische Antikörper (WILKINSON, 1978; FELDMAN et al., 1998). YAMAMOTO et al. (1999) schilderten, dass bei B-Streptokokken das gruppenspezifische Antigen und die typenspezifischen Polysaccharide der Bakterienkapsel eine Resistenz gegenüber der komplement-vermittelten Opsonisation und Phagozytose hervorriefen. ADDERSON et al. (2000) stellten fest, dass das Vorhandensein der Sialinsäure der Mikrokapsel der Bakterienzellen bedeutend für die Interaktion der Mikroorganismen mit dem Immunsystem des Wirts war. Die Sialinsäure bewirkte die Unterbrechung der Komplementkaskade und beugte so der Aktivierung des Komplementsystems über den alternativen Weg vor. Deshalb erwiesen sich spezifische Antikörper als absolut notwendig, um den klassischen Weg des Komplementsystems zu aktivieren (EDWARDS et al., 1980; EDWARDS et al., 1982). MOTLOVÁ et al. (1986) stellten fest, dass B-Streptokokkenkulturen, die Polysaccharidantigene aufwiesen, auch stets Sialinsäure enthielten. Im Umkehrschluss vermuteten die Autoren, dass Isolate, bei denen keine Sialinsäure nachgewiesen werden konnte, offenbar auch keine Polysaccharidantigene exprimierten.

B-Streptokokkenkulturen ohne Polysaccharidantigen werden als nicht typisierbar (NT) bezeichnet (HENRICHSEN et al., 1984). Nach LÄMMLER und BLOBEL (1987a) überwogen bei B-Streptokokken bovinen Ursprungs Proteinantigene, bei humanen Stämmen eher Polysaccharidantigene, entweder allein oder in Verbindung mit Proteinantigenen. Die Autoren berichteten weiter, dass nicht typisierbare Kulturen häufiger bei bovinen Stämmen gefunden wurden.

In den vorliegenden Untersuchungen konnten bei 59,5 % der Kulturen Polysaccharide- bzw. Proteinantigene nachgewiesen werden. PASARIBU et al. (1985) bzw. MOSABI et al. (1997) gelang der Nachweis von Polysaccharid- und Proteinantigenen bei 83,5 % bzw. 85 % der von diesen Autoren untersuchten Kulturen bovinen Ursprungs. Die Zahl der von BOPP und LÄMMLER (1995) bzw. MARTINEZ et al. (2000) untersuchten typisierbaren *S. agalactiae*-Kulturen, isoliert aus Kuhmilch, lag bei 71 % bzw. 38 %. FERRIERI et al. (1997) vermuteten, dass nicht typisierbare B-Streptokokken möglicherweise zu geringe Gehalte an Kapselpolysacchariden produzieren, um typisiert werden zu können. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass diese Streptokokken

Varianten der klassischen Serotypen darstellen, die durch die konventionelle Serotypisierung nicht erfasst werden.

Die Serotypisierung der *S. agalactiae*-Kulturen in der vorliegenden Arbeit ergab eine herkunftsspezifische Verteilung der Typenantigenmuster. Die nachgewiesenen Serotypkombinationen aus Polysaccharid- und Proteinantigenen bzw. das Fehlen jeglicher Polysaccharid- bzw. Proteinantigene erwiesen sich innerhalb der jeweiligen Milchviehbestände als einheitlich. Dabei handelte es sich bei den 20 Isolaten der Betriebe I und II um den Serotyp NT/X und bei den 19 Kulturen des Betriebes III um die Serotypkombination Ia/X. Die sechs Isolate des Betriebes V wiesen den Serotyp III/Rib und die zwei Kulturen des Betriebes VII die Serotypkombination Ib/c $\alpha$  $\beta$  auf. Bereits JENSEN (1980a) beschrieb aufgrund einer geringen und seiner Meinung nach zu vernachlässigenden Serotypenvariation innerhalb jeder Kuhherde sogenannte Herdtypen, das heißt B-Streptokokken mit derselben Serotypkombination innerhalb eines Milchviehbestandes. Auch BRGLEZ et al. (1979) fanden bei Kulturen innerhalb einzelner Kuhherden identische Serotypverteilungen.

Von den in der vorliegenden Arbeit insgesamt 47 typisierbaren Isolaten wiesen acht bzw. zwölf Kulturen von zwei Betrieben ausschließlich das Proteinantigen X auf, ohne dass ein Polysaccharidantigen nachzuweisen war, das heißt NT/X. Vergleichbare Beobachtungen über das alleinige Vorkommen des Proteinantigens X bei B-Streptokokken bovinen Ursprungs machten WIBAWAN (1993), BOPP (1994) sowie BOPP und LÄMMLER (1995). RAINARD et al. (1994) berichteten, dass bei 44 - 85 % der von bovinen Mastitiden isolierten *S. agalactiae*-Stämmen das Proteinantigen X vorkam. YILDIRIM (2002) fand in seinen Untersuchungen bei keiner der von Hund, Katze, Kaninchen, Meerschweinchen, Affe, Pferd, Nutria, Schwein und Mensch isolierten B-Streptokokkenkulturen das Proteinantigen X. Dieses Proteinantigen wurde erstmals von PATTISON et al. (1955a) beschrieben. Untersuchungen von RAINARD et al. (1991a, 1991b) ergaben, dass mit dem Proteinantigen X immunisierte Kühe nach experimenteller Infektion mit *S. agalactiae*-Kulturen, die das Proteinantigen X besaßen, mit einem schnelleren Anstieg der Zellzahl in der Milch reagierten als nicht immunisierte Kühe. Die Milch der immunisierten Tiere wies im Vergleich zu der Milch nicht immunisierter Kühe *in vitro* eine erhöhte bakterizide Aktivität gegen entsprechende *S. agalactiae*-Kulturen auf. B-Streptokokken bovinen Ursprungs

exprimierten auch in den Untersuchungen von FINCH und MARTIN (1984), MORRISON und WRIGHT (1984) sowie COLMAN (1988) überwiegend das Proteinantigen X, welches allein oder in Kombination mit Polysaccharidantigenen, insbesondere dem Typenantigen IV, vorkam (WIBAWAN und LÄMMLER, 1990a, 1990b; WIBAWAN, 1993). Verschiedene Autoren bezeichneten das Proteinantigen X als das bedeutendste Proteinantigen bei vom Rind isolierten B-Streptokokken (BRGLEZ, 1981; MORRISON und WRIGHT, 1984; PASARIBU et al., 1985; COLMAN, 1988; DEVRIESE, 1991). JENSEN (1980a) berichtete, dass der „X-Typ“ nur beim Rind vorzukommen scheint. Das häufige Auftreten dieses Proteinantigens bei rinderpathogenen Streptokokken der serologischen Gruppe B sowie auch bei rinderpathogenen Streptokokken der serologischen Gruppen G und L (BERGNER-RABINOWITZ et al., 1981; LÄMMLER et al., 1987b; WIBAWAN und LÄMMLER, 1990a) wies auf eine spezifische Anpassung der Proteinantigen X-positiven Streptokokken an den Wirtsorganismus Rind hin.

In einem weiteren Betrieb der vorliegenden Untersuchungen wurde bei allen 19 Kulturen die Serotypkombination Ia/X nachgewiesen und zwar sowohl bei der Erst- als auch der Reisolierung der B-Streptokokken acht Monate später. PASARIBU et al. (1985) fanden diese Serotypkombination ebenso sehr häufig bei B-Streptokokken bovinen Ursprungs. MOSABI et al. (1997) wiesen bei bovinen Isolaten am häufigsten die Polysaccharidantigene Ia und III nach. Während LÄMMLER et al. (1993a) sowie ESTUNINGSIH et al. (2002) bei *S. agalactiae*-Kulturen, isoliert aus Mastitismilch von Kühen aus Indonesien häufig die Serotypkombination II/X feststellten, wies keine der in der vorliegenden Arbeit untersuchten 79 Kulturen dieses Typenantigenmuster auf. Statt dessen konnten aus einem Betrieb zwei Kulturen mit dem Serotyp Ib/c $\alpha$  isoliert werden. Die Polysaccharidantigene Ia und Ib wurden erstmals von LANCEFIELD (1938a) beschrieben. Wie Untersuchungen von WILKINSON (1975) ergaben, bestehen die Polysaccharidantigene Ia und Ib hauptsächlich aus Galactose und N-Acetylglucosamin. Sie unterscheiden sich nur aufgrund einer einzelnen glykosidischen Bindung, so dass es sich bei den beiden Polysacchariden um Isomere handelt, die eine unterschiedliche Antigenität aufweisen (JENNINGS et al., 1983). Untersuchungen von BAKER (1990) zeigten, dass B-Streptokokken mit den Polysaccharidantigenen Ia und Ib zu 40-50 % für „early-onset“-Erkrankungen von Neugeborenen verantwortlich waren. ELDAR et al.

(1995) sowie VANDAMME et al. (1997) beschrieben einen B-Streptokokkenstamm, den sie von einem Fisch mit Meningoenzephalitis isoliert hatten und der das Polysaccharidantigen Ib aufwies. Dieser Stamm wurde als *Streptococcus difficile* bezeichnet. Die Autoren vermuteten, dass es sich bei diesem Stamm, wie bereits zuvor schon beschrieben, um eine marine Variante der Spezies *S. agalactiae* handelt, die von einem gemeinsamen Ursprung ausgehend sich an den neuen Wirt Fisch angepasst hatte. HENRICHSEN et al. (1984) beschrieben als weitere antigene Oberflächenstruktur der B-Streptokokken das Proteinantigen c, welches auch als Proteinantigen Ibc bezeichnet wurde (WILKINSON und MOODY, 1969; JENSEN, 1980b; PAYNE und FERRIERI, 1985). Das Proteinantigen c wurde vor allem zusammen mit den Polysaccharidantigenen Ia, Ib, II und III nachgewiesen (WILKINSON und EAGON, 1971; JELÍNKOVÁ, 1977; JENSEN, 1980b, 1982b; PAYNE und FERRIERI, 1985). Nach JOHNSON und FERRIERI (1984) besitzen alle B-Streptokokken des Serotyps Ib auch das Proteinantigen c. Dieses besteht aus vier unabhängig voneinander exprimierten, serologisch unterscheidbaren Komponenten, die mit  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$  bezeichnet werden (WILKINSON und EAGON, 1971; BEVANGER und MAELAND, 1979; BEVANGER und IVERSEN, 1981; BEVANGER, 1983; JOHNSON und FERRIERI, 1984; BRADY et al., 1988; CHUN et al., 1991; MICHEL et al., 1991; FERRIERI und FLORES, 1997). Häufig liegt das c-Proteinantigen allein als  $\alpha$ -Komponente oder in Kombination mit der  $\beta$ -Komponente vor, dagegen eher selten als  $\beta$ -Komponente allein (WIBAWAN und LÄMMLER, 1990a). Darüber hinaus konnte das Proteinantigen  $\alpha$  häufig in Kombination mit den Polysaccharidantigenen Ia, Ib und II nachgewiesen werden, dagegen weniger häufig mit den übrigen Polysaccharidantigenen (FLORES und FERRIERI, 1993; LI et al., 1997; BERNER et al., 2002). Das  $\beta$ -Proteinantigen trat nach BERNER et al. (1999) am häufigsten gemeinsam mit dem Polysaccharidantigen Ib (93 %) und am zweithäufigsten mit dem Polysaccharidantigen II (57 %) auf.

Ein weiterer Milcherzeugerbetrieb der vorliegenden Arbeit beherbergte B-Streptokokkenkulturen mit der Serotypkombination III/Rib. PASARIBU et al. (1985) fanden bei ihren Serotypisierungsuntersuchungen von *S. agalactiae*-Stämmen in keinem Fall die Polysaccharidantigene Ib und III. Dagegen war bei Untersuchungen von *S. agalactiae*-Kulturen durch MARTINEZ et al. (2000) der Serotyp III der mit 28 %

am häufigsten vorkommende Serotyp. Mit spezifisch absorbierten Antiseren konnten BOPP und LÄMMLER (1994) bei Isolaten von bovinen Mastitiden B-Streptokokkenkulturen des Serotyps III/Rib nachweisen. Diese waren zuvor als III/R-Isolate identifiziert worden. Diese Kombination des Proteinantigens Rib mit dem Polysaccharidantigen III wurde auch von anderen Autoren häufig beobachtet (BOPP, 1994; BAKER, 1997; STÅLHAMMAR-CARLEMALM et al., 2000). Dies vornehmlich bei B-Streptokokkenisolaten vom Menschen. Untersuchungen von VAN DEN HEEVER und ERASMUS (1980) ergaben, dass von Kühen isolierte B-Streptokokken v. a. die Polysaccharidantigene Ia, Ib, II bzw. III allein oder in Kombination mit dem Proteinantigen X aufwiesen. LANCEFIELD (1934), RUSSEL und NORCROSS (1972) sowie WESSELS et al. (1987) beschrieben die Struktur und die immunologischen Eigenschaften des Polysaccharidantigens III. Untersuchungen von MUSSER et al. (1989) und WESSELS et al. (1992) zeigten, dass etwa 60 % der von septikämischen Neugeborenen und ca. 80 – 90 % der von Neugeborenen mit Meningitissymptomen isolierten B-Streptokokken den Serotyp III aufwiesen. Auch WILKINSON et al. (1973), BAKER und BARETT (1974), BAKER et al. (1976) sowie ADDERSON et al. (2000) bezeichneten speziell B-Streptokokken des Serotyps III als Hauptverursacher der neonatalen Sepsis und Meningitis. Aufgrund der herausragenden humanmedizinischen Bedeutung von B-Streptokokken mit dem Serotyp III gewannen genetische Methoden zur Identifizierung virulenter und avirulenter Klone innerhalb dieses Serotyps an Bedeutung (NAGANO et al., 1991; LIN et al., 1998; TAKAHASHI et al., 1998; CHAFFIN et al., 2000).

Die Bezeichnung des Proteinantigens Rib leitet sich aus seiner **R**esistenz gegenüber Proteasen, seinen **i**mmunogenen Eigenschaften sowie seinem Auftreten bei einigen Streptokokkenstämmen der Serogruppe **B** ab; es wurde erstmals aus Extrakten einer B-Streptokokkenkultur (BS30) humanen Ursprungs vom Serotyp III isoliert (STÅLHAMMAR-CARLEMALM et al., 1993). Die Autoren berichteten weiter, dass das Proteinantigen Rib einige Gemeinsamkeiten mit dem cß-Proteinantigen aufwies. Untersuchungen von BOPP und LÄMMLER (1994) führten zu der Erkenntnis, dass das Proteinantigen Rib zur R-Proteinfamilie gehört, deren Proteinantigen R erstmals von LANCEFIELD und PERLMAN (1952) beschrieben und von PATTISON et al. (1955a) erstmals bei B-Streptokokkenkulturen bovinen Ursprungs nachgewiesen wurde. Auf der

Basis immunologischer Untersuchungen vermuteten BOPP und LÄMMLER (1994), BEVANGER et al. (1995) sowie FLORES und FERRIERI (1996), dass das Protein Rib mit dem R4-Protein identisch sei. STÅLHAMMAR-CARLEMALM et al. (1993) stellten fest, dass der Rib-Referenzstamm die Serotypkombination III/Rib aufwies.

Bei keiner der in der vorliegenden Arbeit untersuchten *S. agalactiae*-Kulturen konnten die Polysaccharidantigene II, IV, V, VI, VII sowie VIII bzw. die Proteinantigene R oder Ra nachgewiesen werden.

Zur Bestätigung der Ergebnisse der Serotypisierung wurden in den vorliegenden Untersuchungen zusätzlich PCR-Analysen der Gene der nachgewiesenen Proteinantigene c $\beta$  bzw. Rib nach den Angaben von MAELAND et al. (1997) bzw. MAWN et al. (1993) und WÄSTFELT et al. (1996) durchgeführt. Vergleichbare PCR-Analysen für die Gene, die die Polysaccharidantigene Ia, Ib, III, IV, V, VI, VII kodieren, wendeten CHAFFIN et al. (2000), CIESLEWICZ et al. (2001) sowie KONG et al. (2002) an. Obwohl in der vorliegenden Arbeit mittels Immundiffusionsreaktion mit spezifischem Antiserum bei keiner der 79 *S. agalactiae*-Kulturen das c $\beta$ -Proteinantigen nachgewiesen werden konnte, wurde bei den beiden Isolaten des Betriebes VII, die die Serotypkombination Ib/c $\alpha$  aufwiesen, ein positives Ergebnis in der *bag*-Gen-PCR erzielt. Das Gen *bag* kodiert das Proteinantigen c $\beta$ . Vergleichbare positive PCR-Reaktionen bei fehlendem immunologischen Nachweis der Proteinantigene c $\alpha$  und c $\beta$  wurden bereits von JERLSTRÖM et al. (1996), MAELAND et al. (1997, 1999, 2000) sowie YILDIRIM (2002) beschrieben. MAELAND et al. (1997) vermuteten bei den betroffenen Kulturen einen Defekt in der Genregulation, so dass es nicht zu einer Expression des Proteins kommen konnte. BERNER et al. (1999) wiesen mit der *bag*-Gen-PCR das entsprechende Gen am häufigsten bei Stämmen des Typs Ib (93 %) und des Typs II (57 %) nach.

In der vorliegenden Arbeit konnte im weiteren bei allen sechs Kulturen mit der Serotypkombination III/Rib mittels der *rib*-Gen PCR das entsprechende Gen detektiert werden. Alle übrigen untersuchten 73 Kulturen waren *rib*-PCR-negativ. YILDIRIM (2002) konnte bei vergleichbaren PCR-Untersuchungen 18 *rib*-positive Kulturen feststellen, von denen drei in der Immundiffusion keine Reaktion mit Proteinantigen Rib-spezifischem Antiserum gezeigt hatten. Bei zukünftigen serologischen Verfahren zum Nachweis der Polysaccharid- bzw. Proteinantigene und vergleichsweise



durchgeführten PCR-vermittelten Analysen sind diese Unterschiede, die auf eine fehlende Expression des jeweiligen Antigens oder auf eine geringe Sensitivität des immunologischen Nachweisverfahrens hindeuten, zu berücksichtigen.

Die in den vorliegenden Untersuchungen festgestellten identischen Serotypkombinationen bzw. der einheitlich fehlende Nachweis von Polysaccharid- bzw. Proteinantigenen der *S. agalactiae*-Kulturen in den einzelnen Milcherzeugerbetrieben deuteten, wie die bereits zuvor genannten biochemischen Eigenschaften, auf eine Verwandtschaft der Isolate innerhalb der einzelnen Betriebe hin.

Das Pigmentbildungsvermögen der in der vorliegenden Arbeit untersuchten 79 *S. agalactiae*-Kulturen nach anaerober Anzüchtung in GBS-Islam-Agar bietet eine weitere Möglichkeit zur phänotypischen Charakterisierung. MERRITT und JACOBS (1976, 1978) beschrieben das Pigment von B-Streptokokken als  $\beta$ -Karotinoid. Studien von WENNERSTRÖM et al. (1985) deuteten auf eine Beziehung zwischen dem Pigmentbildungsvermögen und der Hämolysinaktivität der B-Streptokokken hin. Die Autoren stellten fest, dass die Kulturen nach mutagener Behandlung sowohl ihre Fähigkeit zur Hämolyse als auch zur Pigmentbildung einbüßten. Nichthämolisierende Isolate waren in der Regel auch unpigmentiert. SPELLERBERG et al. (2000) entdeckten, dass die beiden Gene, die das Hämolysin und die Pigmentbildung kodieren, sich auf demselben Genabschnitt befinden. Von den in der vorliegenden Arbeit untersuchten 79 *S. agalactiae*-Kulturen bildeten 26, 6 % ein deutlich rotes Pigment. Zu diesen Kulturen zählten alle fünf Erst- und 14 Reisolate des Betriebes III sowie die zwei Kulturen des Betriebes VII. Diese Isolate wiesen auf Schafblutagar eine schmale  $\beta$ -Hämolysezone auf. Bei zehn der zwölf Kulturen des Betriebes II konnte ein orangefarbenes Pigment und bei den verbleibenden zwei Isolaten desselben Betriebes ein gelbliches Pigment festgestellt werden, wobei alle Kulturen eine relativ deutliche  $\beta$ -Hämolysezone bildeten. Ein gelbliches Pigment konnte weiterhin bei den acht Isolaten des Betriebes I, bei sechs Kulturen des Betriebes V und bei den sieben B-Streptokokkenkulturen des Betriebes VI nachgewiesen werden. Alle diese Isolate zeigten auf Schafblutagar eine schmale  $\beta$ -Hämolysezone. Die 17 Erst- sowie die acht Reisolate des Betriebes IV (31,6 %) blieben völlig unpigmentiert, wiesen jedoch eine schmale  $\beta$ -Hämolysezone auf. Über die Fähigkeit zur Pigmentbildung bei B-Streptokokken bovinen Ursprungs gibt es in der Literatur widersprüchliche Angaben.

So berichteten beispielsweise BRGLEZ (1983), FINCH und MARTIN (1984), PASARIBU et al. (1985), LÄMMLER und BLOBEL (1987a), DEVRISSE (1991), LÄMMLER et al. (1993a) sowie WIBAWAN (1993) von einer überwiegend fehlenden Pigmentierung boviner B-Streptokokkenkulturen und von einer vermehrten Bildung eines orangeroten Pigmentes bei B-Streptokokkenkulturen humanen Ursprungs. ESTUNINGSIH et al. (2002) stellten in einer Studie sogar fest, dass 100 % der untersuchten bovinen *S. agalactiae*-Kulturen unpigmentiert blieben. Dagegen hielten MOSABI et al. (1997) die Pigmentproduktion sowohl bei bovinen als auch bei humanen Stämmen für charakteristisch. YILDIRIM (2002) berichtete, dass nahezu alle von Hund, Katze, Kaninchen, Meerschweinchen, Affe, Pferd, Nutria, Schwein und Mensch isolierten B-Streptokokken eine deutliche Pigmentierung aufwiesen, wohingegen die vom Rind isolierten *S. agalactiae*-Kulturen nur vereinzelt und darüber hinaus eine verminderte Pigmentbildung zeigten. In den vorliegenden Untersuchungen wiesen die Kulturen innerhalb der einzelnen Betriebe ein identisches bzw. im Betrieb II ein sehr ähnliches Pigmentbildungsvermögen auf. Zwischen den Betrieben traten jedoch relativ deutliche Unterschiede auf. Dies wies erneut, wie bereits bei den zuvor beschriebenen Eigenschaften der Kulturen, auf verwandtschaftliche Beziehungen der B-Streptokokkenisolate innerhalb jedes einzelnen Betriebes hin.

Ein weiteres Charakteristikum von B-Streptokokken stellt ihr Wachstumsverhalten in Flüssigmedium und Softagar dar. Hierbei waren von verschiedenen Autoren Unterschiede zwischen B-Streptokokken bovinen und humanen Ursprungs festgestellt worden (MAJERT, 1931; KLIMMER und HAUPT, 1933; MÜLLER, 1967; LÄMMLER und BLOBEL, 1987a; WIBAWAN und LÄMMLER, 1990b; LÄMMLER et al., 1993a; WIBAWAN, 1993). So wuchsen bovine Isolate in Flüssigmedium als granuläres, watteartig bis körniges Sediment mit klarem Überstand unter Ausbildung überwiegend langer Ketten, während B-Streptokokken, isoliert vom Menschen, ein Wachstum unter gleichmäßiger Trübung des Flüssigmediums mit überwiegend kurzen Ketten zeigten. WIBAWAN und LÄMMLER (1990b) berichteten über einen Zusammenhang zwischen dem Vorkommen des Proteinantigens X bei *S. agalactiae*-Kulturen und der Sedimentbildung in Flüssigmedium bzw. dem Auftreten von kompakten Kolonien in Softagar. LÄMMLER et al. (1993a) erklärten, dass das Auftreten des Proteinantigens X bzw. des vermutlich geringeren Neuraminsäuregehaltes

der Mikrokapsel der bovinen *S. agalactiae*-Kulturen das Wachstum in Form eines Sedimentes bei ansonsten klarem Überstand verursachten. Von den in der vorliegenden Arbeit untersuchten 79 *S. agalactiae*-Isolaten zeigten 92,4 % in Flüssigmedium ein Wachstum mit körnigem Bodensatz und klarem Überstand. Diese Kulturen wiesen die Serotypkombinationen NT/X, Ia/X bzw. Ib/cαβ auf oder waren nicht typisierbar. Bis auf die nicht typisierbaren Kulturen des Betriebes IV, die in Form kompakt-diffuser Kolonien in Softagar wuchsen, wiesen alle Isolate ein Wachstum in Form kompakter Kolonien in Softagar auf. Dagegen zeigten die sechs Kulturen des Betriebes V mit der Serotypkombination III/Rib ein Wachstum unter gleichmäßiger Trübung des Flüssigmediums bzw. bildeten diffuse Kolonien in Softagar. Diese Zusammenhänge entsprachen den Angaben von WIBAWAN (1993), SALASIA et al. (1994), YILDIRIM (2002). Laut WIBAWAN und LÄMMLER (1992) sowie WIBAWAN (1993) waren diese Wachstumsunterschiede korreliert mit dem Vorkommen von Polysaccharid- bzw. Proteinantigenen und der sich hieraus ergebenden fehlenden oder vermehrten Oberflächenhydrophobizität der Kulturen. Interessanterweise zeigten die Kulturen innerhalb der einzelnen Betriebe jeweils identische Wachstumseigenschaften, was wiederum auf eine Verwandtschaft der Kulturen innerhalb des jeweiligen Milchviehbestandes hindeutete.

Das Vorkommen der verschiedenen Typenantigene stand, wie bereits oben erwähnt, nach WIBAWAN und LÄMMLER (1992) sowie WIBAWAN (1993) außerdem im Zusammenhang mit der Oberflächenhydrophobizität und dem Adhärenzverhalten der B-Streptokokkenkulturen. Bakterielle Infektionen werden generell initiiert durch die Adhärenz der pathogenen Keime an epitheliale Zellen eines Wirtsorganismus (ARP et al., 1988). Diese Adhärenz wird durch verschiedene spezifische und unspezifische physikochemische Interaktionen, die hauptsächlich mit hydrophoben Oberflächenstrukturen verbunden sind, hervorgerufen (BEACHEY, 1982; HOSCHUTZKY et al., 1989; KURL et al., 1989; DOYLE und ROSENBERG, 1990; DESLAURIERS und MOUTON, 1992; HASTY et al., 1992). Nach WIBAWAN und LÄMMLER (1992) wiesen B-Streptokokkenkulturen mit Proteinantigenen an der Oberfläche eine vermehrte Oberflächenhydrophobizität auf, welche in Beziehung zu einer deutlichen Adhärenz, aber auch zu einer vermehrten Phagozytose der Kulturen stand. Dies galt insbesondere für vom Rind isolierte *S. agalactiae*-Kulturen mit dem

Proteinantigen X. Kulturen mit Polysaccharidantigenen zeigten bei geringerer Oberflächenhydrophobizität eine verminderte Adhärenz an Zellstrukturen, waren aber besser geschützt vor Phagozytose.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Analyse der Oberflächenhydrophobizität der *S. agalactiae*-Kulturen mit Hilfe des Salz-Aggregationstests (SAT) und des Hexadecan-Adhärenztests. Beide Untersuchungsverfahren ergaben eine betriebspezifische Verteilung identischer bzw. sehr ähnlicher Eigenschaften der untersuchten Kulturen. Beim SAT wurden die Bakterien bei unterschiedlichen Ammoniumsulfatkonzentrationen aggregiert. Von den untersuchten 79 Isolaten zeigten 83,5 % der Kulturen bei Ammoniumsulfat-Konzentrationen von 0,05 - 0,2 mol/ l eine Aggregationsreaktion, was auf eine hydrophobe Oberfläche der Kulturen hinwies. Zu diesen zählten alle Isolate mit dem Proteinantigen X, außerdem die zwei Kulturen mit der Serotypkombination Ib/cαß aus dem Betrieb VII sowie alle 17 nicht typisierbaren Erst- und die acht ebenfalls nicht typisierbaren Reisolat des Betriebes IV. Alle diese Kulturen wurden im parallel durchgeführten Hexadecan-Adhärenztest ebenso als stark hydrophob beurteilt. Bei einer Ammoniumsulfat-Konzentration von 0,4 mol/ l konnte bei weiteren 8,9 % der Isolate, welche sämtlich aus dem Betrieb VI stammten und nicht typisierbar waren, erstmals eine Aggregationsreaktion festgestellt werden. Dieselben *S. agalactiae*-Kulturen erwiesen sich ebenso im Hexadecan-Adhärenztest als mäßig hydrophob. Der SAT ergab bei den sechs Kulturen mit der Serotypkombination III/Rib aus Betrieb V erst bei einer Ammoniumsulfat-Konzentration von 2,4 mol/ l eine entsprechende Reaktion. Dies wies auf eine hydrophile Oberfläche dieser Kulturen hin. Im Hexadecan-Adhärenztest verhielten sich dieselben Kulturen ebenso hydrophil. Vergleichbare Beziehungen zwischen den Wachstumseigenschaften in Flüssigmedium und Softagar, Serotyp und Oberflächeneigenschaften von B-Streptokokken stellten bereits LÄMMLER und BLOBEL (1987a), WIBAWAN und LÄMMLER (1992), WIBAWAN et al. (1992a, 1992b) sowie WIBAWAN et al. (1993a) fest.

Die in den vorliegenden Untersuchungen nachgewiesenen Serotypkombinationen, das Wachstumsverhalten der Kulturen in Flüssigmedium und Softagar sowie die Oberflächenhydrophobizität der Isolate erwiesen sich als einheitlich bzw. weitestgehend einheitlich für die Kulturen des jeweiligen Betriebes. Von Betrieb zu Betrieb unterschieden sich die Eigenschaften der Kulturen zum Teil deutlich voneinander.

WIBAWAN et al. (1993b) beschrieben ein zur Agglutination von Erythrozyten führendes, hitzelabiles Oberflächenprotein einiger B-Streptokokkenkulturen, welches als Hämagglutinin bezeichnet wird. Auf einen Zusammenhang zwischen der Expression des Proteinantigens X, mikroaerophiler Anzüchtung und hämagglutinierenden Eigenschaften von B-Streptokokken, isoliert vom Rind, wies WIBAWAN (1993) hin. WIBAWAN et al. (1993b) stellten fest, dass 43,4 % der bovinen B-Streptokokkenkulturen zur Hämagglutination von Kaninchenerythrozyten fähig waren. Von diesen Isolaten exprimierten 83,3 % das Proteinantigen X. Darüber hinaus waren jedoch auch einige nicht typisierbare Kulturen zu einer vergleichbaren Agglutination von Kaninchenerythrozyten befähigt. Alle untersuchten hämagglutinationspositiven Isolate zeigten nach WIBAWAN et al. (1993b) ausgesprochen hydrophobe Oberflächeneigenschaften. Daraus konnte jedoch nicht geschlossen werden, dass alle hydrophoben Stämme auch hämagglutinationspositiv sind. Keine der untersuchten B-Streptokokkenkulturen, isoliert vom Menschen, führte zu einer Agglutination von Kaninchenerythrozyten. Die Autoren vermuteten, dass bei B-Streptokokken bovinen Ursprungs das Hämagglutinin in Adhärenzvorgänge zwischen Bakterienzelle und Wirtsorganismus involviert ist.

Der in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Hämagglutinationstest ergab, dass von den untersuchten 79 *S. agalactiae*-Isolaten 46,8 % der Kulturen in der Lage waren, sowohl Kaninchen- als auch Schaferythrozyten zu agglutinieren. Diese hämagglutinationspositiven *S. agalactiae*-Kulturen erwiesen sich auch als Proteinantigen X-positiv. Dazu zählten die acht Isolate des Betriebes I sowie zehn von zwölf Kulturen des Betriebes II mit dem Serotyp NT/X und die fünf Erst- sowie 14 Reisolat des Betriebes III mit der Serotypkombination Ia/X. Die Intensität der Agglutinationsfähigkeit der einzelnen Kulturen erwies sich als einheitlich innerhalb der jeweiligen Betriebe. Die verbleibenden zwei Kulturen des Betriebes II mit dem Serotyp NT/X waren ausschließlich zur Agglutination von Kaninchenerythrozyten in der Lage. Die sechs Kulturen des Betriebes VI mit der Serotypkombination III/Rib bzw. die zwei Isolate des Betriebes VII mit dem Serotyp Ib/cαβ sowie die nicht typisierbaren Isolate der Betriebe IV und VI, die zusammen 50,7 % der untersuchten Kulturen ausmachten, wiesen keine hämagglutinierenden Eigenschaften auf. Auch die Eigenschaft, Kaninchenerythrozyten zu agglutinieren bzw. das fehlende Hämagglutinationsvermögen

von B-Streptokokken bestimmter Betriebe wies auf das Vorkommen einzelner verwandter Bakterienstämme innerhalb der jeweiligen Betriebe hin. YILDIRIM (2002) stellte fest, dass von Hund, Katze, Kaninchen, Meerschweinchen, Affe, Pferd, Nutria und Schwein isolierte B-Streptokokken ebenfalls nicht zur Hämagglutination befähigt waren.

Einen weiteren Virulenzfaktor von Streptokokken der serologischen Gruppe B stellt das Enzym Hyaluronidase dar, auch als Hyaluronatlyase bezeichnet, welches zunächst fälschlicherweise als Neuraminidase charakterisiert worden war (GREILING et al., 1975; MILLIGAN et al., 1978; SUGAHARA et al., 1979; BROWN und STRAUS, 1987; PRITCHARD und LIN, 1993; LIN et al., 1994; OZEGOWSKI et al., 1994; GUNTHER et al., 1996; PRITCHARD et al., 2000; BAKER und PRITCHARD, 2000; RODIG et al., 2000). Die Bildung dieses Enzyms durch B-Streptokokken wurde erstmals von McCLEAN (1941) beschrieben. WERNER et al. (1951) sowie GERLACH und KÖHLER (1972) wiesen Hyaluronidasen bei Streptokokken der serologischen Gruppen A, B, C, G und L sowie *S. mitis* nach. Die Hyaluronidase wird zu den gewebsinvasiven Faktoren gezählt, da sie die 1,4-glykosidische Bindung zwischen dem N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosamin und dem D-Glucuronidsäurerest der Hyaluronsäure spaltet, dadurch die Kittsubstanz des Bindegewebes auflöst und somit als sogenannter „Spreading Factor“ eine vermehrte Ausbreitung der Bakterien im Gewebe bewirkt (DURAN-REYNALS, 1942; LUDOWIEG et al., 1961; KARLSON, 1984). B-Streptokokken scheinen im Vergleich zu anderen Streptokokkenarten vermehrt Hyaluronidasebildner zu sein, wobei JELINKOVA (1977) auch B-Streptokokken bovinen Ursprungs untersuchte, die relativ geringe Mengen des Enzyms produzierten. B-Streptokokken, die große Mengen dieses Enzyms bildeten, erwiesen sich nach MILLIGAN et al. (1978) sowie KJEMS et al. (1980) als besonders virulent. DURHAM et al. (1981) und BENCHETRIT et al. (1987) konnten keinen Zusammenhang zwischen einer hohen Hyaluronidaseaktivität und spezifischen Serotypen klinischer B-Streptokokkenisolate erkennen. GÜNTHER et al. (1996) bzw. HAUGE et al. (1996) berichteten von einem Prozentsatz von 72 % bzw. 78,8 % hyaluronidasepositiver B-Streptokokken. Beide Autoren gaben an, dass hyaluronidasepositive Stämme die Serotypen Ia, Ib, II und V aufwiesen, während die Typ III-Kulturen hyaluronidasen negativ waren. Die Reinigung und eingehende

Charakterisierung dieses Enzyms erfolgte durch OZEGOWSKI et al. (1994), wobei die Autoren ein Molekulargewicht von 116 kDa nachwiesen. Das die Hyaluronidase kodierende Gen *hyB* der B-Streptokokken wurde von LIN et al. (1994) sowie GASE et al. (1998) kloniert und sequenziert. STEINER et al. (1997) analysierten das Gen bzw. die exprimierte Hyaluronidase von *Propionibacterium acnes*. Die Basensequenz wies Homologien mit der des entsprechenden Gens von *Streptococcus pneumoniae*, *S. agalactiae* und *S. aureus* auf. HYNES und WALTON (2000) gaben einen zusammenfassenden Überblick über die bisherigen Erkenntnisse bezüglich der Hyaluronidase von *S. agalactiae* und anderer grampositiver Bakterien.

In den vorliegenden Untersuchungen erfolgte der Nachweis der Hyaluronidaseaktivität mit Hilfe des Dekapsulationstestes mit einer mukoid wachsenden *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*-Kultur. Die nach Aussagen von KIEMS et al. (1980), GRANLUND et al. (1998), ROLLAND et al. (1999) sowie YILDIRIM (2002) mit dem Vorkommen des Polysaccharidantigens III, häufig in Verbindung mit dem Proteinantigen Rib, korrelierte fehlende Hyaluronidaseaktivität konnte in der vorliegenden Arbeit nicht festgestellt werden. Alle untersuchten 79 *S. agalactiae*-Kulturen, einschließlich der sechs Isolate des Betriebes V mit der Serotypkombination III/Rib, erwiesen sich als hyaluronidasepositiv. Auch HAUGE et al. (1996) konnten bei Typ III-Stämmen eine Hyaluronidaseaktivität nachweisen.

Die in der vorliegenden Untersuchung erzielten Ergebnisse des Dekapsulationstestes wurden mit Hilfe einer *hyB*-Gen-PCR mit 18 *S. agalactiae*-Kulturen, die eine repräsentative Auswahl aller gefundenen Serotypkombinationen und auch der nicht typisierbaren Isolate aller sieben Betriebe darstellten, überprüft und bestätigt. Die nach GRANLUND et al. (1998) verwendeten Oligonukleotidprimer erlaubten die Amplifikation des gesamten Gens. Bei allen untersuchten Kulturen ergab die PCR ein Amplikon mit einer einheitlichen Größe von 3,3 Kilobasenpaaren (Kb). In keinem Fall konnte das von ROLLAND et al. (1999) beschriebene Insertionselement *IS1548* innerhalb des *hyB*-Gens mit einer Größe von 0,98 Kb amplifiziert werden. Die Bedeutung dieses das *hyB*-Gen inaktivierende Insertionselementes einiger B-Streptokokkenkulturen vom Typ III, isoliert von Neugeborenen, ist bisher nicht geklärt (ROLLAND et al., 1999). Untersuchungen von GRANLUND et al. (1998) zeigten jedoch, dass das Insertionselement *IS1548* charakteristisch für Streptokokken der

serologischen Gruppe B vom Serotyp III war, welche bei Endokarditisfällen des Menschen vorkamen.

Zur weitergehenden Charakterisierung der *S. agalactiae*-Kulturen eignete sich die Untersuchung ihres Resistenzverhaltens gegenüber Antibiotika. Einen Überblick über Antibiotikaresistenzen bei Bakterien, unter anderem auch bei B-Streptokokken, gaben LYON und SKURRAY (1987), LECLERCQ und COURVALIN (1991a, 1991b), QUINTILLIANI Jr. und COURVALIN (1995), ROBERTS (1996) sowie PAULSEN et al. (1996). SCHWARZ und WERCKENTHIN (1997, 1998) berichteten über zahlreiche Resistenzgene von Streptokokken und Staphylokokken und deren Nukleotidsequenzen.

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Erstellung von Resistenzmustern zwölf Antibiotika ausgewählt. Alle untersuchten 79 Isolate erwiesen sich gegenüber Penicillin G, Oxacillin, Bacitracin (10 I. E.), Erythromycin, Clindamycin und Cefotaxim als empfindlich. Diese Ergebnisse entsprachen weitestgehend den Angaben von KIM (1987), BERKOWITZ et al. (1990), BUU-HOI (1990), WIBAWAN et al. (1991) sowie KO et al. (2001). Gegenüber Polymyxin B, Colistin und Sulphamethoxazol / Trimethoprim zeigten alle Kulturen eine Resistenz. Die Empfindlichkeit gegenüber Tetracyclin, Minocyclin und Gentamicin war variabel. Eine Tetracyclinresistenz trat immer gemeinsam mit einer Resistenz gegenüber Minocyclin auf. Davon betroffen waren 16,5 % der untersuchten Kulturen, zu denen, entgegen den Erkenntnissen von NAGANO et al. (1989), nicht die Kulturen des Serotyps Ia, sondern die sechs Isolate des Betriebes V mit der Serotypkombination III/Rib und sieben nicht typisierbare Kulturen des Betriebes VI gehörten. LÄMMLER et al. (1993b) berichteten von einer überwiegenden Empfindlichkeit von B-Streptokokkenisolaten gegenüber Tetracyclin. NAGANO et al. (1989) sowie SCHWARZ et al. (1994) untersuchten B-Streptokokken von Schwein, Nutria, Rind und Mensch hinsichtlich einer kombinierten Resistenz gegenüber Tetracyclin und Minocyclin. Die Autoren stellten fest, dass die meisten von Rindern isolierten Stämme gegenüber beiden Antibiotika sensibel reagierten. Da keine Plasmide nachgewiesen werden konnten, folgerten die Autoren daraus, dass Gene, welche für diese kombinierte Resistenz verantwortlich sind, in der chromosomalen DNA lokalisiert sind. BROWN und ROBERTS (1991) sowie SCHWARZ et al. (1992, 1994) beschrieben das Vorkommen entsprechender Tetracyclinresistenzgene *tet* (M)-



und *tet* (O). Bei Streptokokken der serologischen Gruppen G und L konnten SOEDARMANTO et al. (1995) ebenfalls diese *tet* (M)- und *tet* (O)-Resistenzgene nachweisen. LÄMMLER et al. (1995) gingen von einer sehr weit verbreiteten Resistenz gegenüber Tetracyclin und Minocyclin innerhalb von Streptokokken der Serogruppe B aus. TROLLDENIER (1996) gab an, dass 1,5 % der Galtstreptokokken gegenüber Penicillin, 4 % gegenüber Oxacillin, 19 % gegenüber Erythromycin und 31 % gegenüber Tetracyclin resistent seien. KRABISCH et al. (1999) bezifferten die Penicillin G-Resistenz von *S. agalactiae* auf ca. 4,8 % und die Resistenz gegenüber Tetracyclin auf 33,9 %. In Untersuchungen von WITTKOWSKI et al. (1999) zur Resistenzentwicklung von *S. agalactiae* aus boviner Mastitismilch wurde deutlich, dass bis zu 72,2 % der untersuchten Stämme keinerlei Resistenzen gegen die Antibiotika Penicillin G, Tetracyclin und Erythromycin aufwiesen. Von den verbleibenden Kulturen zeigten 45,7 % Resistenzen gegenüber Tetracyclin, 10,2 % gegenüber Penicillin G und 4,8 % gegenüber Erythromycin. In der vorliegenden Arbeit erwiesen sich 87,3 % der *S. agalactiae*-Kulturen als resistent gegenüber Gentamicin. TROLLDENIER (1997) berichtete, dass 92 % der Galtstreptokokken gegenüber Gentamicin resistent seien. In der vorliegenden Arbeit wiesen die B-Streptokokkenkulturen innerhalb der einzelnen Betriebe jeweils identische Resistenzmuster bzw. Empfindlichkeiten auf. Der einzige Unterschied zeigte sich im Verhalten der Kulturen des Betriebs II gegenüber Gentamicin. Von den zwölf Isolaten erwiesen sich nur zwei als resistent. Die verbleibenden zehn *S. agalactiae*-Kulturen zeigten eine intermediäre Reaktion gegenüber diesem Antibiotikum. Diese überwiegend vorkommende betriebsweise Verteilung der Resistenzeigenschaften der Kulturen deuteten wiederum auf eine enge Verwandtschaft der Kulturen innerhalb der einzelnen Milchviehbestände hin.

Für die Infektionsepidemiologie, deren besondere Aufgabe die Ermittlung von Infektionsquellen und Übertragungswegen für pathogene Keime ist, gewannen in den letzten Jahren verschiedene molekularbiologische Verfahren an Bedeutung wie z. B. die Ribotypisierung (HUET et al., 1993; RIVAS et al., 1997), die „Restriction Endonuclease Analysis“ (DENNING et al., 1989), die „DNA Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis“ (BLUMBERG et al., 1992; JAYARAO et al., 1992; HAUGE et al., 1996), die „Multilocus Enzyme Electrophoresis“ (QUENTIN et al., 1995; ROLLAND et al., 1999; COMBE et al., 2000) und die „Randomly

Amplified Polymorphic DNA Analysis“ (CHATTELIER et al., 1997; GILLESPIE et al., 1997; MARTINEZ et al., 2000). Seit etwa 15 Jahren steht mit der Makrorestriktionsanalyse der chromosomalen DNA und der sich anschließenden Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) ein sensitives und spezifisches Trennverfahren zur Verfügung, um die chromosomale bakterielle DNA im Größenbereich von 50 - 6000 Kb aufzutrennen (GARDINER, 1991). Mit dieser Methode kann der „genomische Fingerabdruck“ (DNA-„fingerprint“), das Makrorestriktionsfragmentlängenmuster, für die Identifizierung von Bakterien herangezogen werden. GORDILLO et al. (1993) hielten die PFGE zur Untersuchung von epidemiologischen Zusammenhängen bei B-Streptokokken für die aussagefähigste Typisierungsmethode. Die Autoren führten die Makrorestriktionsanalyse mit Hilfe der Enzyme *SmaI* und *SalI* durch. GREEN et al. (1994) isolierten bei Neugeborenen mit wiederkehrenden B-Streptokokkeninfektionen jeweils die Kulturen der ersten und zweiten Episode der Erkrankung und führten eine epidemiologische Untersuchung unter Verwendung des Restriktionsenzym *SmaI* durch, wobei in fünf von sieben Fällen beide zusammengehörenden Kulturen dasselbe Restriktionsmuster aufwiesen. MOSCHETTI et al. (1998) sowie DMITRIEV et al. (1997, 1998) führten ebenfalls PFGE-Untersuchungen bei B-Streptokokken durch. Laut GROTHUES und TÜMLER (1991) steht mit der Methode ein Verfahren zur Verfügung, mit dessen Hilfe Infektionsquellen und Übertragungswege von bakteriellen Erregern ermittelt und die Diversität und klonale Struktur von Bakterienpopulationen aufgeklärt werden können. Die PFGE stellt nach RÖMLING et al. (1994, 1995) die Methode der Wahl, den sogenannten Goldstandard für die epidemiologische Typisierung der meisten Mikroorganismen, die für eine Infektionskrankheit verantwortlich gemacht werden, dar. Die Autoren gaben einen umfassenden Überblick über die Methode der Makrorestriktionsanalyse und die eigentliche PFGE. Dabei wird u. a. die Methode der Gewinnung der bakteriellen DNA beschrieben, wobei die Bakterien in eine Gelmatrix eingebettet und lysiert, das intakte Bakterienchromosom so gegen Scherbruch geschützt und anschließend mit selten schneidenden Restriktionsenzymen in eine überschaubare Zahl von zumeist sieben bis 20 Fragmenten definierter Länge gespalten werden. Laut GOERING (1998) eignen sich für GC-reiche Sequenzen Enzyme, die Hexanukleotide aus A und T erkennen, und analog für AT-reiche Genome eignen sich Enzyme, die eine hexamere Sequenz aus G oder C

erkennen, wie z. B. *SmaI* (CCC↓GGG), *ApaI* (GGGCC↓C), *SrfI* (GCCC↓GGGC), *SfiI* (GGCCNNNN↓NGGCC) sowie *SalI* (G↓TCGAC). GOERING (1998) empfahl darüber hinaus die Nutzung eines zweiten oder dritten Enzyms zur sicheren Interpretation der Fragmentmuster.

GARDINER (1991) erkannte, dass die Passage eines Moleküls durch die Poren eines Agarosegels umso länger dauert, je größer dieses Molekül ist. Fragmente mit einer Größe von 100 - 200 Bp bis zu einer Größe von 50 Kb werden gewöhnlich mit der Standard-Agarosegelelektrophorese in einem konstanten elektrischen Feld separiert. Bei größeren Fragmenten verliert das Gel seine Siebfunktion, so dass diese mit hoher Geschwindigkeit als lange Schmierbanden durch das Gel laufen. Die PFGE unterscheidet sich von der Standardelektrophorese dadurch, dass sie kein konstantes elektrisches Feld zur Separierung der Fragmente nutzt. Sie setzt die DNA einem elektrischen Feld aus, das seine Richtung wechselt. Die DNA ist aufgrund ihres Phosphatgruppengerüsts negativ geladen. Fließt nun Strom von der negativ geladenen Elektrode A (Anode) zur positiv geladenen Elektrode B (Kathode), wandert die DNA entlang des Stromflusses. Dabei bewegen sich kleinere Moleküle schneller durch die Poren des Gels als größere. Bei der PFGE wird in vorbestimmten Abständen der Stromfluss von A nach B unterbrochen, und die Anode C tritt in Aktion. Der Strom fließt nun von C nach D. Die DNA muss sich dem Stromfluss entsprechend neu ausrichten, was den kleineren Molekülen schneller gelingt als den großen. Erst dann können die Moleküle durch eine neue Pore ihren Lauf im Gel fortsetzen. Demnach verbleibt mit zunehmender Größe der Moleküle immer weniger Zeit für die Wanderung in Feldrichtung, daraus folgt die bei der PFGE zu beobachtende Auftrennung der linearen DNA-Moleküle nach dem Molekulargewicht. Diese ständig wechselnde Stromflussrichtung wird während des gesamten Gellaufes aufrechterhalten, so dass die DNA einem Zickzackpfad folgt, der in seiner Nettobewegung dem unteren Ende des Gels entgegenstrebt. Dieser Vorgang wird in der englischsprachigen Literatur auch als „reptation“ bezeichnet. GARDINER (1991) hielt den Begriff „pulsed-field gel electrophoresis“ für unzutreffend, da dieser eine tote Zeit zwischen den Pulsen impliziert. Die Autorin verwendete stattdessen den Begriff „alternating field electrophoresis“. Der in der vorliegenden Arbeit für die PFGE genutzte, sogenannte „contour clamp homogeneous electric field“ (CHEF)-Apparat bildet ein Hexagon an

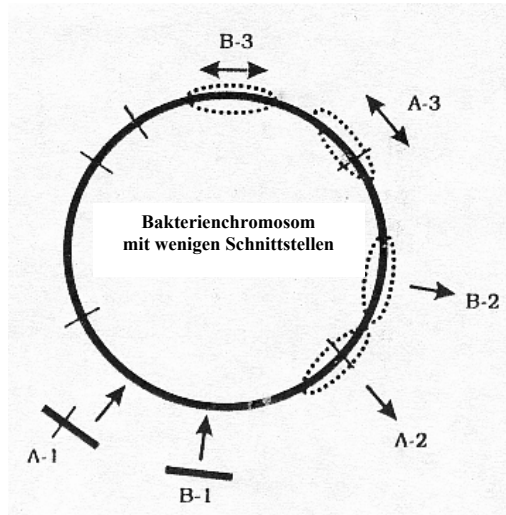
Punktelektroden, die in einem Winkel von  $120^\circ$  zueinander positioniert sind. Die Parameter Puffertemperatur und -zusammensetzung, Temperatur und Ionenstärke des Gels, Spezifikation und Konzentration der verwendeten Agarose sowie der Winkel und die Konfiguration der Elektroden zueinander werden stets konstant gehalten, während die Pulszeit und die Stärke des elektrischen Feldes variiert werden können. Die Puffertemperatur sollte laut GARDINER (1991) zwischen 4 und  $15^\circ\text{C}$  gehalten werden, da die DNA-Fragmente umso schneller durch das Gel laufen, je höher die Temperatur ist. Pulszeit und Feldstärke sind die entscheidenden Parameter, die den während der PFGE aufgetrennten Molekulargewichtsbereich festlegen. Wenn Pulszeit und/oder elektrisches Feld erhöht werden, führt dies auch zur Separierung der größeren Moleküle. Während DNA-Fragmente im Längenbereich von 10 - 1000 Kb typischerweise mit Feldern von 4 - 7 V/ cm aufgetrennt werden, sollte die Elektrophorese von DNA-Molekülen im Megabasenpaarbereich mit Feldern  $< 2$  V/ cm durchgeführt werden. Zu lange Pulszeiten spiegeln der DNA ein konstantes elektrisches Feld vor, so dass diese als langgestreckte Bande durch das Gel läuft und nicht aufgetrennt wird. Zur Trennung kleinerer Fragmente erfolgt die Verkürzung der Pulszeit.

Der Vergleich der mit der PFGE aufgetrennten Fragmente, insbesondere die quantitative Auswertung der Fragmentlängenmuster, erfordert eine reproduzierbare und vergleichbare kollineare Auftrennung in allen Spuren des Gels. RÖMLING et al. (1995) stellten fest, dass, wenn alle Stämme auf einem einzigen Gel analysiert werden konnten, der visuelle Vergleich der Fragmentlängenmuster in der Regel ausreichte. Der Vergleich von Mustern verschiedener Gele erfordert jedoch eine sorgfältige Kontrolle. Die experimentellen Bedingungen sollten so weit wie möglich standardisiert werden. Längenstandards, sogenannte Marker, sind auf die äußeren und die mittlere Spur aufzutragen, um Inhomogenitäten des elektrischen Feldes zu erfassen. Abweichungen in der Güte eines DNA-„fingerprints“ beruhen in der Regel auf Partialverdau, Methylierung der Schnittstellen, unzureichender Auflösung oder Signalintensität, Fehlinterpretationen von Doppel- und Mehrfachbanden oder dem Verlust kleiner Fragmente ( $< 20$  Kb) aus dem Gel.

Die Identifizierung von Stämmen, die zu einem Klon gehören, ist sicherlich die wichtigste Anwendung der Infektionsepidemiologie. TENOVER et al. (1995) sowie

GOERING (1998) berichteten, dass das entstandene Fragmentlängenmuster den Genotyp eines Bakterienstammes definiert. Miteinander verwandte Stämme einer Spezies werden anhand ihrer Ähnlichkeit im Fragmentlängenmuster erkannt. Der quantitative Fragmentlängenvergleich erlaubt eine Definition von „Klon“ und „klonalen Varianten“ innerhalb einer Spezies. Schnittstellen für die Restriktionsenzyme sind selektionsneutrale Marker, die im Verlauf der Evolution des Bakterienchromosoms über Rearrangements oder Mutationen an einer Stelle des Genoms verloren gehen und an anderer Stelle neu entstehen können. Die nicht miteinander verwandten Klone einer Spezies zeichnen sich durch unterschiedliche Fragmentlängenmuster aus, während die Varianten eines Klons sehr ähnliche oder identische Fragmentlängenmuster besitzen. RÖMLING et al. (1995) gaben an, dass sich alle klassischen Fragestellungen der Infektionsepidemiologie mit dem DNA-„fingerprint“ untersuchen lassen. Man kann Infektionswege im Organismus verfolgen, die genomische Variation der Erreger während chronischer Infektionen beobachten und den Erfolg hygienischer Maßnahmen überprüfen. Um die Ähnlichkeitsbeziehungen zwischen Klonen und klonalen Varianten zu veranschaulichen, werden anschließend Clusteranalysen von den Fragmentlängenmustern durchgeführt und in Form von Dendrogrammen präsentiert (TENOVER und GOERING, 1997).

GOERING (1998) erklärte die verschiedenen genetischen Ereignisse, die auf das Genom einwirken können (Abb. A).



**Abb. A: Überblick über verschiedene chromosomale genetische Ereignisse. Darstellung von Insertionen (A-1, B-1), Deletionen (A-2, B-2) und Rearrangements (A-3, B-3) unter stattfindender (jeweils A) oder ausbleibender Einflussnahme (jeweils B) auf eine Restriktionsstelle im Genom; nach GOERING, 1998.**

In einer weiteren Abbildung (Abb. B) interpretierte GOERING (1998) die nach Einwirkung dieser genetischen Ereignisse entstandenen Fragmentmuster. Im Vergleich zu dem in der Mitte der Abbildung B gezeigten epidemiologisch verantwortlichen Referenzmuster üben die unter A-1 bis A-3 aufgeführten genetischen Ereignisse durch eine Veränderung einer Schnittstelle des Genoms einen Einfluss auf das Fragmentmuster aus. Die unter B-1 und B-2 dargestellten genetischen Ereignisse haben zwar keinen Einfluss auf die Schnittstellen, bewirken jedoch durch Einfügen bzw. durch Entfernen von DNA-Abschnitten eine Änderung im Fragmentmuster, während das unter



Betrieb V mit dem Serotyp III/Rib gelang mit dem Enzym *SmaI* keine Restriktion. Innerhalb des Betriebes I existierten zwei Muster, die sich in zwei Fragmenten voneinander unterschieden. Diese Differenz könnte nach GOERING (1998) durch Insertion bzw. Deletion eines DNA-Sequenzabschnitts außerhalb einer *SmaI*-Schnittstelle hervorgerufen worden sein. Die Kulturen des Betriebes II zeigten ebenfalls zwei Restriktionsmuster, wobei der Unterschied in drei Banden bestand. GOERING (1998) erklärte eine solche Differenz mit einer Insertion bzw. einer Deletion im Schnittstellenbereich des betroffenen Genoms. Innerhalb der Betriebe III und IV waren ebenso jeweils zwei Fragmentmuster nachzuweisen. Die Restriktionsmuster jedes dieser beiden Betriebe zeigten jeweils nur einen Unterschied von einem Fragment auf. Dieses genetische Ereignis ist laut GOERING (1998) zwar theoretisch möglich, aber äußerst selten. So könnte die Deletion eines DNA-Fragmentes mit beiden flankierenden Schnittstellen zum Verlust eines einzelnen Fragmentes im PFGE-Muster führen. Die relative Seltenheit solcher genetischen „events“ lässt vermuten, dass die meisten beschriebenen Einzelfragmentdifferenzen in Wirklichkeit Zweifragmentunterschiede sind, bei denen eines der Fragmente hinter einem gleichgroßen versteckt ist, mit dem es in der Elektrophorese koimigrierte.

Die *S. agalactiae*-Kulturen der Betriebe VI und VII wiesen innerhalb des jeweiligen Betriebes ein identisches Fragmentmuster auf.

Mit der vergleichsweise eingesetzten Restriktionsendonuklease *Apal* waren innerhalb der 79 *S. agalactiae*-Isolate der vorliegenden Untersuchung zwölf unterschiedliche Fragmentmuster nachzuweisen, wobei sich die chromosomale DNA der sechs Kulturen des Serotyps III/Rib aus dem Betrieb V auch mit diesem Enzym nicht schneiden und auftrennen ließ. Bei den Kulturen des Betriebes I konnten mit diesem Enzym drei Bandenmuster unterschieden werden, die sich in ein bis zwei Fragmenten voneinander unterschieden. Die drei Restriktionsmuster der Isolate des Betriebes II wiesen eine Differenz von ein bis drei Banden auf. Das Enzym *Apal* erwies sich somit als geeigneter für den Nachweis verwandtschaftlicher Beziehungen der Kulturen innerhalb dieser beiden Betriebe, da im Gegensatz zum *SmaI* jeweils drei unterschiedliche Fragmentmuster entstanden. Bei den Kulturen der Betriebe III und IV konnten wiederum, wie schon mit dem Enzym *SmaI*, zwei verschiedene Bandenmuster mit



jeweils einem abweichenden Fragment festgestellt werden. Die Isolate der Betriebe VI und VII wiesen erneut ein einheitliches Muster innerhalb des jeweiligen Betriebes auf. Die Isolate des Betriebes V, deren DNA mit den Enzymen *Sma*I bzw. *Apa*I nicht geschnitten werden konnte, wurden unter Verwendung der Restriktionsendonuklease *Sal*I analysiert. Das entstandene Bandenmuster aller sechs Kulturen dieses Betriebes war identisch. Bereits FASOLA et al. (1993) berichteten in einer Studie, dass die DNA einiger Stämme mehrfach analysiert werden musste, um ein deutliches, aussagefähiges Fragmentmuster zu erhalten. Unter den von FASOLA et al. (1993) untersuchten Kulturen befanden sich zwei Stämme, die nicht mit der PFGE beurteilt werden konnten. Bei diesen zwei Isolaten war kein Bandenmuster zu erhalten, obwohl die DNA-Präparation und die Elektrophorese mehrfach wiederholt worden waren. GARDINER (1991) sowie RÖMLING et al. (1995) gaben zu bedenken, dass Methylierungsmuster an den für die Restriktionsenzyme typischen Schnittstellen des bakteriellen Chromosoms die Spalthäufigkeit in unerwarteter Weise beeinflussen können. Dies kann zu einer vollständigen Hemmung der Restriktion führen. Eine Methylierung der Schnittstellen der Enzyme *Sma*I und *Apa*I kann möglicherweise in der vorliegenden Untersuchung auch bei den sechs *S. agalactiae*-Kulturen des Betriebes V eine Restriktion verhindert haben. Die nach TENOVER et al. (1995) allgemein gültige Richtlinie für den epidemiologischen Vergleich von PFGE-Fragmentmustern besagt, dass Isolate, die in bis zu drei Bandenpositionen differieren, aus einem einzigen genetischen „event“ entstanden sein können. Solche Isolate stellen möglicherweise epidemiologisch eng verwandte Subtypen desselben Stammes dar. Kulturen, die in mehr als drei Positionen differieren, können nach TENOVER et al. (1995) ebenfalls miteinander verwandt sein, wobei die verwandtschaftlichen Beziehungen der entsprechenden Kulturen jedoch nicht so eng seien. Die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Restriktionsmuster der Kulturen, die innerhalb der Betriebe V, VI bzw. VII jeweils identisch waren, zwischen den einzelnen Betrieben jedoch Unterschiede aufwiesen, können demnach als Klone oder Stämme innerhalb des jeweiligen Betriebes bezeichnet werden. Die Kulturen der Betriebe I, II, III bzw. IV sind innerhalb des jeweiligen Betriebes als Subtypen eines Ursprungsklons zu werten.

BASEGGIO et al. (1997) untersuchten neben anderen Mastitisstreptokokken auch *S. agalactiae* mittels PFGE. Die Autoren beurteilten dieses Untersuchungsverfahren für

die Differenzierung verschiedener Bakterienstämme einer Spezies als äußerst praktisch zur Beantwortung epidemiologischer Fragestellungen hinsichtlich der Quelle der jeweiligen Infektion. In der Studie analysierten die Autoren zwölf *S. agalactiae*-Isolate aus drei Herden und stellten fest, dass die *Sma*I-Fragmentmuster der Isolate innerhalb jeder Herde identisch oder sehr ähnlich waren. Im Gegensatz dazu wiesen die Fragmentmuster zwischen den einzelnen Herden große Unterschiede auf. Diese Kernaussage kann auch für die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen getroffen werden. Die fehlende oder sehr geringe Variation zwischen den Mustern der *S. agalactiae*-Isolate innerhalb jeder der sieben untersuchten Milchviehbestände läßt vermuten, dass ein einziger Bakterienklon bzw. wenige Subtypen eines Klonen in jeder Herde zu der subklinischen Mastitis führten. Diese Annahme kann unter anderem damit erklärt werden, dass es sich bei *S. agalactiae* um einen obligat intramammären Mikroorganismus handelt, der beispielsweise durch das Melken von Tier zu Tier übertragen wird. Daher kann sich ein einziger Klon über die gesamte Herde ausbreiten. WANG et al. (1999) nutzten ebenso die PFGE zur epidemiologischen Analyse von *S. agalactiae*-, *S. dysgalactiae*- und *S. uberis*-Isolaten. Die Autoren verwendeten dabei ebenfalls die Restriktionsendonuklease *Sma*I. Die untersuchten Streptokokken der serologischen Gruppe B stammten sämtlich aus einem Milchviehbetrieb und wiesen ein identisches Fragmentmuster mit Fragmentgrößen zwischen 10 und 500 Kb auf. Auch diese Ergebnisse deuteten auf das Vorhandensein eines einzigen Klonen in dem betroffenen Bestand hin und bestätigten die Übertragung dieses Mastitisserregers von Kuh zu Kuh. Ähnliche Feststellungen trafen AKINEDEN et al. (2000) bei der Untersuchung von *S. aureus*-Stämmen, isoliert aus boviner Mastitismilch. Dagegen erwiesen sich *S. uberis*-Kulturen, isoliert von Kühen mit subklinischer Mastitis aus acht Milcherzeugerbetrieben, als äußerst heterogen, so dass nur selten Kulturen, die von verschiedenen Kühen eines Bestandes isoliert worden waren, dasselbe Muster zeigten (KHAN et al., 2000). ESTUNINGSIH et al. (2002) vermuteten aufgrund des vermehrten Vorkommens von *S. agalactiae*-Kulturen des Serotyps II/X klonale Verwandtschaften zwischen diesen Isolaten verschiedener Milchviehbestände in Indonesien. Die Makrorestriktionsanalyse der Kulturen eines Betriebes ergab identische bzw. sehr nahe verwandte Restriktionsmuster. Die meisten anderen Stämme schienen aber, dem Restriktionsmuster nach zu urteilen, nicht miteinander verwandt zu sein. Eine

vergleichbar hohe genetische Diversität wurde bei *S. agalactiae*-Kulturen, isoliert von Kühen in Kanada festgestellt (MARTINEZ et al., 2000).

Mit Hilfe der Makrorestriktion chromosomaler DNA und anschließender PFGE kann die Art und Weise sowie der Grad der Ausbreitung einer Infektionskrankheit innerhalb einer Population gezeigt werden. Diese Informationen ermöglichen den Einsatz effizienter, zielorientierter Maßnahmen zur Infektionskontrolle und Bekämpfung, um eine weitere Ausbreitung der Infektion zu verhindern.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, dass jeder der untersuchten Milcherzeugerbetriebe seinen eigenen typischen *S. agalactiae*-Stamm bzw. wenige eng verwandte Stämme beherbergt, welche sich für die jeweilige Mastitissituation als verantwortlich erwiesen. Diese Aussage konnte durch betriebsweise sehr ähnliche bis identische phänotypische Merkmale, wie die Serotypkombinationen, das Pigmentbildungsvermögen, die Wachstumseigenschaften der *S. agalactiae*-Kulturen in Flüssigmedium und Softagar, ihre Oberflächenhydrophobizität, die Fähigkeit zur Agglutination von Kaninchenerythrozyten und das Resistenzverhalten der B-Streptokokkenisolate gegenüber verschiedenen Antibiotika sowie letztlich durch Makrorestriktion der chromosomalen DNA und anschließender PFGE, aufgezeigt werden. Bei der Untersuchung der *S. agalactiae*-Kulturen der Betriebe III und IV, welche von der Erst- und der acht Monate später erfolgten Reisolierung stammten, konnten, unabhängig vom Isolierungszeitpunkt, jeweils zwei typische, innerhalb des einzelnen Betriebes eng verwandte Restriktionsmuster festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass die Sanierung der beiden Betriebe nicht erfolgreich durchgeführt worden war, so dass einige der *S. agalactiae*-Kulturen der beiden erstmals aufgetretenen Subtypen des jeweils betriebseigenen Ursprungsstammes überleben und zu einer erneuten Infektion führen konnten. Eine konsequente Eradikation des Galterregers in betroffenen Milcherzeugerbetrieben ist also von besonderer Bedeutung für die angestrebte Galtfreiheit in hessischen Milchviehherden.

## 6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden 79 *Streptococcus agalactiae*-Kulturen, isoliert von subklinischen Mastitiden von 54 Kühen aus sieben Milcherzeugerbetrieben des Bundeslandes Hessen, mittels konventioneller sowie molekularer Methoden vergleichend untersucht. Bei den zunächst angewandten Identifizierungsverfahren handelte es sich unter anderem um eine biochemische Differenzierung, die serologische Gruppenbestimmung sowie um den durch Polymerasekettenreaktion (PCR)-vermittelten Nachweis von speziesspezifischen Abschnitten der 16S rDNA, der 16S-23S rDNA „intergenic spacer“-Region und um den Nachweis des CAMP-Faktor-Gens *cfb*.

An die Identifizierung schlossen sich Typisierungsverfahren zur weitergehenden Charakterisierung der *S. agalactiae*-Kulturen an. Dabei erfolgte eine Unterteilung der Isolate aufgrund spezifischer Polysaccharid- und Proteinantigene in Serotypen, teilweise bestätigt durch PCR-vermittelte Gennachweise. Charakteristisch für die meisten *S. agalactiae*-Isolate war das Vorkommen des Proteinantigens X, entweder allein oder in Kombination mit dem Polysaccharidantigen Ia. Bei sechs Kulturen eines Betriebes konnte die Serotypkombination III/Rib nachgewiesen werden. Zwei weitere Isolate eines anderen Betriebes wiesen den Serotyp Ib/ $\alpha\beta$  auf. Die verbleibenden Kulturen waren nicht typisierbar. Weitere phänotypische Merkmale, die eine Unterscheidung der Kulturen der jeweiligen Betriebe ermöglichten, waren der Grad der Pigmentierung, das Wachstum der Kulturen in Flüssigmedium und Softagar, die Oberflächenhydrophobizität der Isolate, das Vermögen, Erythrozyten zu agglutinieren sowie das Resistenzverhalten der Isolate gegenüber Tetracyclin und Minocyclin. Die *S. agalactiae*-Kulturen der verschiedenen Milcherzeugerbetriebe wiesen jeweils identische oder sehr ähnliche Eigenschaften auf. Eine abschließende molekulare Charakterisierung der 79 *S. agalactiae*-Kulturen erfolgte durch Makrorestriktion der chromosomalen DNA unter Verwendung der Restriktionsendonukleasen *Sma*I und *Apa*I bzw. *Sal*I und anschließender Pulsfeldgelelektrophorese. Die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Restriktionsmuster waren innerhalb der einzelnen Betriebe identisch bzw. zeigten nur geringe Abweichungen, während zwischen den Betrieben deutliche Unterschiede der Restriktionsmuster festgestellt werden konnten. Aufgrund der phäno- und genotypischen Eigenschaften der Kulturen der vorliegenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass in einzelnen Betrieben ein einzelner *S. agalactiae*-Stamm bzw. wenige Subtypen dieses Stammes für die jeweilige Mastitissituation verantwortlich zu sein scheinen.

## 7. Summary

In the present investigation 79 streptococcal cultures isolated from subclinical mastitis of 54 cattle from seven dairy farms in Hesse, Germany, were comparatively investigated by using conventional and molecular studies. The cultures were identified as *Streptococcus agalactiae*, belonging to Lancefield's serological group B by determination of biochemical and serological properties and by polymerase chain reaction (PCR) amplification of species specific parts of the 16S ribosomal DNA, the 16S-23S rDNA intergenic spacer region and the CAMP factor gene *cfb*.

The investigated group B streptococci were further characterized serologically for specific polysaccharide and protein antigens, partly supported by PCR-amplification of the respective genes. Serotyping the isolates revealed a predominance of the surface protein X, either alone or in combination with polysaccharide antigen Ia. Six group B streptococci from one farm displayed the serotype pattern III/Rib. Two isolates from another farm showed the serotype pattern Ib/ $\alpha\beta$ . The remaining cultures were non typable. Additional phenotypic properties which allowed a differentiation of the various cultures were the grade of pigmentation, the growth properties in fluid media and softagar, the surface hydrophobicity, the ability to hemagglutinate rabbit erythrocytes and the resistance reaction to tetracycline and minocyclin. The isolates of the various farms showed identical or almost identical characteristics. The 79 group B streptococci were additionally investigated by macrorestriction analysis of their chromosomal DNA by using the restriction endonucleases *Sma*I, *Apa*I and *Sal*I. The restriction patterns obtained by pulsed-field gel electrophoresis displayed identical or almost identical patterns for the cultures of the various farms, respectively, but different patterns for isolates among the various dairy farms. The pheno- and genotypic characteristics of the 79 group B streptococci of the present study revealed that a single *S. agalactiae* strain or at least closely related subtypes of this strain were responsible for the mastitis situation of the farms, respectively.

## 8. LITERATURVERZEICHNIS

**ABDULMAWJOOD, A., WEIB, R., and LÄMMLER, CH., 1998:**

Species identification of *Streptococcus porcinus* by restriction fragment length polymorphism analysis of 16S ribosomal DNA.  
Res. Vet. Sci. **65**: 85-86.

**ABDULMAWJOOD, A., and LÄMMLER, CH., 1999:**

Amplification of 16S ribosomal RNA gene sequences for the identification of streptococci of Lancefield group B.  
Res. Vet. Sci. **67**: 159-162.

**ABDURAHMAN, O. A., AGAB, H., ABBAS, B., and ASTROM, G., 1995:**

Relations between udder infection and somatic cells in camel (*Camelus dromedarius*) milk.  
Acta Vet. Scand. **36**: 423-431.

**ADDERSON, E. E., TAKAHASHI, S., and BOHNSACK, J. F., 2000:**

Bacterial genetics and human immunity to group B streptococci.  
Mol. Gen. Metabol. **71**: 451-454.

**AHMET, Z., STANIER, P., HARVEY, D., and HOLT, D., 1999:**

New PCR primers for the sensitive detection and specific identification of group B beta-hemolytic streptococci in cerebrospinal fluid.  
Mol. Cell. Probes **13**: 349-357.

**AKINEDEN, Ö., HASSAN, A. A., ANNEMÜLLER, C., LÄMMLER, CH., WOLTER, W. und ZSCHÖCK, M., 2000:**

Molekulare Untersuchung zum Vorkommen von Virulenzfaktoren bei *Staphylococcus aureus*-Kulturen, isoliert von subklinischen Rindermastitiden.  
41. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene vom 25.09.-28.09.2000 in Garmisch-Partenkirchen. Tagungsbericht: 703-708.

**AMBORSKI, R. L., SNIDER III, T. G., THUNE, R. L., and CULLER, D. D., 1983:**

A non-hemolytic, group B streptococcus infection in cultured bullfrogs, *Rana catesbeiana*, in Brazil.  
J. Wildlife Dis. **19**: 180-184.

**ARP, L.H., LEYH, R. D., and GRIFFITH, R. W., 1988:**

Adherence of *Bordetella avium* to tracheal mucosa of turkeys: correlation with hemagglutination.  
Am. J. Vet. Res. **49**: 693-696.

**BAKER, C. J., and BARETT, F. F., 1974:**

Group B streptococcal infections in infants. The importance of the various serotypes.  
JAMA **230**: 1158-1160.

**BAKER, C. J., KASPER, D. L., and DAVID, C. E., 1976:**

Immunochemical characterization of the "native" type III polysaccharide of group B *Streptococcus*.  
J. Exp. Med. **143**: 258-270.

**BAKER, C. J., 1980:**

Group B streptococcal infections.  
In: Stollerman, G., H., (ed.)  
Adv. Intern. Med. **25**: 475-501.

**BAKER, C. J., 1990:**

Immunization to prevent group B streptococcal disease: victories and vexations.  
J. Infect. Dis. **161**: 917-921.

**BAKER, C. J., 1997:**

Group B streptococcal infections.  
Clin. Perinatol. **24**: 59-70.

**BAKER, J. R., and PRITCHARD, D. G., 2000:**

Action pattern and substrate specificity of the hyaluronate lyase from group B streptococci.

Biochem. J. **348**: 465-471.

**BARKEMA, H. W., SCHUKKEN, Y. H., LAM, T. J., GALLIGAN, D. T., BEIBOER, M. L., and BRAND, A., 1997:**

Estimation of interdependence among quarters of the bovine udder with subclinical mastitis and implications for analysis.

J. Dairy Sci. **80**: 1592-1599.

**BARRY, T., COLLERAN, G., GLENNON, M., DUNICAN, L. K., and GANNON, F., 1991:**

The 16S-23S ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria.

PCR Meth. Appl. **1**: 51-56.

**BARTFIELD, A. A., 2000:**

Bacterial meningitis.

Prim. Care Update Ob. Gyns. **7**: 49-54.

**BARTLETT, P. C., MILLER, G. Y., LANCE, S. E., HANCOCK, D. D., and HEIDER, L. E., 1992:**

Managerial risk factors of intramammary infection with *Streptococcus agalactiae* in dairy herds in Ohio.

Am. J. Vet. Res. **53**: 1715-1721.

**BASEGGIO, N., MANSELL, P. D., BROWNING, J. W., and BROWNING, G. F., 1997:**

Strain differentiation of isolates of streptococci from bovine mastitis by pulsed-field gel electrophoresis.

Mol. Cell. Probes **11**: 349-354.

**BEACHEY, E. H., 1982:**

Die Adhärenz von Bakterien an Schleimhautoberflächen.

Immun. Infekt. **10**: 51-56.

**BECKER, H., 1994:**

*Streptococcus agalactiae* (Group B streptococci).

In: The significance of pathogenic microorganisms in raw milk.

International Dairy Federation, Brüssel, Belgium: 43-54.

**BENCHETRIT, L. C., AVELINO, C. C., and OLIVEIRA, C. M., 1987:**

Hyaluronidase activity of group B streptococci.

Braz. J. Med. Biol. Res. **20**: 411-414.

**BENTLEY, R. W., LEIGH, J. A., and COLLINS, M. D., 1991:**

Intragenic structure of *Streptococcus* based on comparative analysis of small-subunit rRNA sequences.

Int. J. Syst. Bacteriol. **41**: 487-494.

**BENTLEY, R. W., LEIGH, J. A., and COLLINS, M. D., 1993:**

Development and use of species-specific oligonucleotide probes for differentiation of *Streptococcus uberis* and *Streptococcus parauberis*.

J. Clin. Microbiol. **31**: 57-60.

**BENTLEY, R. W., and LEIGH, J. A., 1995:**

Development of PCR-based hybridisation protocol for identification of streptococcal species.

J. Clin. Microbiol. **33**: 1296-1302.

**BERGNER-RABINOWITZ, S., FERNE, M., FLEIDERMAN, S., ZIV, G., SARAN, A., and WINKLER, M., 1981:**

Group G type X: a new antigenic combination in streptococci isolated from cases of bovine mastitis in Israel.

Vet. Microbiol. **6**: 383-387.

**BERKOWITZ, K., REGAN, J. A., and GREENBERG, E., 1990:**

Antibiotic resistance patterns of group B streptococci in pregnant women.

J. Clin. Microbiol. **27**: 5-7.

- BERNER, R., BENDER, A., RENSING, C., FORSTER, J., and BRANDIS, M., 1999:**  
Low prevalence of the immunoglobulin-A-binding  $\beta$  antigen of the c protein among *Streptococcus agalactiae* isolates causing neonatal sepsis.  
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **18**: 545-550.
- BERNER, R., RUESS, M., BERESWILL, S., and BRANDIS, M., 2002:**  
Polymorphisms in the cell wall-spanning domain of the C protein beta-antigen in clinical *Streptococcus agalactiae* isolates are caused by genetic instability of repeating DNA sequences.  
Pediatr. Res. **51**: 106-111.
- BERNHEIMER, A. W., LINDER, R., and AVIGAD, L. S., 1979:**  
Nature and mechanism of action of the CAMP protein of group B streptococci.  
Infect. Immun. **23**: 838-844.
- BERRIDGE, B. R., FULLER, J. D., DE AZAVEDO, J., LOW, D. E., BERCOVIER, H., and FRELIER, P. F., 1998:**  
Development of specific nested oligonucleotide PCR primers for the *Streptococcus iniae* 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacer.  
J. Clin. Microbiol. **36**: 2778-2781.
- BERRIDGE, B. R., BERCOVIER, H., and FRELIER, P. E., 2001:**  
*Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus difficile* 16S-23S intergenic rDNA: genetic homogeneity and species-specific PCR.  
Vet. Microbiol. **78**: 165-173.
- BEVANGER, L., and MAELAND, J. A., 1979:**  
Complete and incomplete Ibc protein fractions of group B streptococci.  
Acta Pathol. Microbiol. Scand. **87**: 51-54.
- BEVANGER, L., and IVERSEN, O. J., 1981:**  
The Ibc protein fraction of group B streptococci: characterization of protein antigens extracted by HCl.  
Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. **89**: 205-209.
- BEVANGER, L., 1983:**  
Ibc proteins as serotype markers of group B streptococci.  
Acta Pathol. Microbiol. Scand. **91**: 231-234.
- BEVANGER, L., KVAM, A. I., and MAELAND, J. A., 1995:**  
A *Streptococcus agalactiae* R protein analysed by polyclonal and monoclonal antibodies.  
APMIS **103**: 731-736.
- BHUTTA, Z. A., and YUSUF, K., 1997:**  
Early-onset neonatal sepsis in Pakistan: a case control study of risk factors in a birth cohort.  
Am. J. Perinatol. **14**: 577-581.
- BIDDOCH, et RADWAY, 1904:**  
Schweiz. Arch. Tierhik. **46**  
zitiert nach MAJERT, 1931.
- BILLROTH, T., 1874:**  
Untersuchungen über die Vegetationsformen von *Coccobacteria septica*.  
G. Reimer Verlag, Berlin.
- BINGEN, E., DENAMUR, E., LAMBERT-ZECHOVSKY, N., AUJARD, Y., BRAHIMI, N., GESLIN, P., and ELION, J., 1992:**  
Analysis of DNA restriction fragment length polymorphism extends the evidence for breast milk transmission in *Streptococcus agalactiae* late-onset neonatal infection.  
J. Infect. Dis. **165**: 569-573.
- BLUMBERG, H. M., STEPHENS, D. S., LICITRA, C., PIGOTT, N., FACKLAM, R., SWAMINATHAN, B., and WACHSMUTH, I. K., 1992:**  
Molecular epidemiology of group B streptococcal infections: use of restriction endonuclease analysis of chromosomal DNA and DNA restriction fragment length polymorphisms of ribosomal RNA genes (ribotyping).  
J. Infect. Dis. **166**: 574-579.



**BÖRGER, K., 1951:**

Die Bedeutung der Euter-, Zitzen- und allgemeinen Hautreinigung für die Gewinnung keimarmer Milch unter besonderer Berücksichtigung von keimtötenden Spezialmitteln.  
Inauguraldissertation bei der Tierärztlichen Hochschule Hannover.

**BOPP, V., 1994:**

Vergleichende Untersuchung von Streptokokken der serologischen Gruppe B (*Streptococcus agalactiae*) isoliert von Rindern in Thüringen und Hessen.  
Inauguraldissertation beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.

**BOPP, V., and LÄMMLER, CH., 1994:**

Comparative studies on novel protein antigens of streptococci of the serological group B.  
Med. Microbiol. Lett. **3**: 291-299.

**BOPP, V., and LÄMMLER, CH., 1995:**

Comparative studies of group B streptococci isolated from bovine milk samples in Thuringia and Hesse.  
J. Vet. Med. **42**: 427-433.

**BOYER, P. J., 1997:**

Outbreak of clinical mastitis in dairy cows following „blitz“ therapy.  
Vet. Rec. **141**: 55.

**BRADY, L. J., DAPHTARY, U. D., AYOUB, E. M., and BOYLE, M. D. P., 1988:**

Two novel antigens associated with group B streptococci identified by a rapid two-stage radioimmunoassay.  
J. Infect. Dis. **158**: 965-972.

**BRAMMER, H., 1981:**

Untersuchungen zum Vorkommen von *Streptococcus agalactiae* und *Staphylococcus aureus* in Tonsillen und Lymphknoten gesunder Kälber und Jungrinder unter Berücksichtigung der peripartalen Mastitis bei Erstkalbinnen.  
Inauguraldissertation bei der Tierärztlichen Hochschule Hannover.

**BRANDIS, H., EGGERS, H. J., KÖHLER, W., und PULVERER, G., (Hrsg.), 1994:**

In: Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie.  
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart / Jena, 7. Auflage: S. 370.

**BRENNWALD, 1848:**

Schweiz. Arch. Tierhkl. **10**: 6.  
zitiert nach MAJERT, 1931.

**BRGLEZ, I., JELINKOVA, J., KELJ-KRIZAN, B. Z., and KASTELIC, M., 1979:**

Findings of serotypes of group B streptococci in human and bovine sources.  
J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. **23**: 155-158.

**BRGLEZ, I., 1981:**

Ein Beitrag zu den Untersuchungen der Infektion bei Kühen und Menschen durch *S. agalactiae*.  
Zbl. Bakt. Mikrobiol. Hyg. **172**: 434-439.

**BRGLEZ, I., 1983:**

Pigment production in human and bovine *Streptococcus agalactiae* strains.  
Zbl. Bakt. Mikrobiol. Hyg. **177**: 533-538.

**BRGLEZ, I., STROPNIK, Z., and BATIS, J., 1986**

Phagetypes of human and bovine *Streptococcus agalactiae* isolates in Slovenia.  
Zbl. Bakt. Mikrobiol. Hyg. **182**: 401-406.

**BRIDGE, P. D., and SNEATH, P. H. A., 1983:**

Numerical taxonomy of *Streptococcus*.  
J. Gen. Microbiol. **129**: 565-597.

**BROWN, 1939:**

Double-zone beta hemolytic streptococci: the cultural characteristics, serological grouping occurrence and pathogenic significance.  
J. Bacteriol. **37**: 133.

- BROWN, J., FARNSWORTH, R., WANNAMAKER, L. W., and JOHNSON, D. W., 1974:**  
CAMP factor of group B streptococci: production, assay, and neutralization by sera from immunized rabbits and experimentally infected cows.  
*Infect. Immun.* **9**: 377-383.
- BROWN, J. G., and STRAUS, D. C., 1987:**  
Characterization of neuraminidases produced by various serotypes of group B streptococci.  
*Infect. Immun.* **55**: 1-6.
- BROWN, M. B., and ROBERTS, M. C., 1991:**  
Tetracycline resistance determinants in streptococcal species isolated from the bovine mammary gland.  
*Vet. Microbiol.* **29**: 173-180.
- BRÜCKLER, J., WIBAWAN, I. W. T., and LÄMMLER, CH., 1990:**  
CAMP-reaction among skin isolates obtained from a dog with acute squamous eczema.  
*J. Vet. Med.* **37**: 767-769.
- BRYAN, C. S., 1934:**  
*Vet. Med.* **29**: 384.  
zitiert nach GROSSENBACHER, 1951.
- BUGGE, R., 1924:**  
*Dt. Tierärztl. Wschr.* **32**: 8.  
zitiert nach MAJERT, 1931.
- BUSATO, A., TRACHSEL, P., SCHÄLLIBAUM, M., and BLUM, J. W., 2000:**  
Udder health and risk factors for subclinical mastitis in organic dairy farms in Switzerland.  
*Prev. Vet. Med.* **44**: 205-220.
- BUSEMAN, K., 1964:**  
Versuche zur diagnostischen Klärung des Streptokokkenbefalls gesunder Kuheuter unter besonderer Berücksichtigung des *Sc. agalactiae*.  
Inauguraldissertation bei der Tierärztlichen Hochschule Hannover.
- BUSSE, H.-J., DENNER, E. B. M., and LUBITZ, W., 1996:**  
Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics.  
*J. Biotechnol.* **47**: 3-38.
- BUTTER, M. N. W., and De MOOR, C. E., 1967:**  
*Streptococcus agalactiae* as a cause of meningitis in the newborn and bacteraemia in adults. Differentiation of human and animal varieties.  
Antonie van Leeuwenhoek *J. Microbiol.* **33**: 439-450.
- BUU-HOI, A., BOUGUENEC, C. L. E., and HORAUD, T., 1990:**  
High-level chromosomal gentamicin resistance in *Streptococcus agalactiae* (group B).  
*Antimicrob. Agents Chemother.* **34**: 958-988.
- CAMPBELL, J. R., HILLIER, S. L., KROHN, M. A., FERRIERI, P., ZALEZNIK, D. F., and BAKER, C. J., 2000:**  
Group B streptococcal colonization and serotype-specific immunity in pregnant women at delivery.  
*Obstet. Gynecol.* **96**: 498-503.
- CHAFFIN, D. O., BERES, S. B., YIM, H. H., and RUBENS, C. E., 2000:**  
The serotype of type Ia and III group B streptococci is determined by the polymerase gene within the polycistronic capsule operon.  
*J. Bacteriol.* **182**: 4466-4477.
- CHANTER, N., COLLIN, N., HOLMES, N., BINNS, M., and MUMFORD, J., 1997:**  
Characterization of the Lancefield group C *Streptococcus* 16S-23S rRNA gene intergenic spacer and its potential for identification and sub-specific typing.  
*Epidemiol. Infect.* **118**: 125-135.

- CHATELLIER, S., RAMANANTSOA, C., HARRIAU, P., ROLLAND, K., ROSENAU, A., and QUENTIN, R., 1997:**  
Characterization of *Streptococcus agalactiae* strains by randomly amplified polymorphic DNA analysis.  
J. Clin. Microbiol. **35**: 2573-2579.
- CHENG, M. M., and WATANAKUNAKORN, C., 1999:**  
Toxic shock syndrome caused by group B *Streptococcus*.  
Infect. Dis. Clin. Pract. **8**: 458-460.
- CHRISTENSEN, P., KAHLMEYER, G., JONSON, S., and KRONVALL, G., 1973:**  
A new method for the serological grouping of streptococci with specific antibodies adsorbed to protein A-containing staphylococci.  
Infect. Immun. **7**: 881-885.
- CHRISTIE, R., ATKINS, N. E., and MUNCH-PETERSEN, E., 1944:**  
A note on a lytic phenomenon shown by group B streptococci.  
Aust. J. Exp. Biol. **22**: 197-200.
- CHUN, C. Y. S., BRADY, L. J., BOYLE, M. D. P., DILLON, H. C., and AYOUB, E. M., 1991:**  
Group B streptococcal c protein-associated antigens: association with neonatal sepsis.  
J. Infect. Dis. **163**: 786-791.
- CIESLEWICZ, M. J., KASPER, D. L., WANG, Y., and WESSELS, M. R., 2001:**  
Functional analysis in type Ia group B *streptococcus* of a cluster of genes involved in extracellular polysaccharide production by diverse species of streptococci.  
J. Biol. Chem. **276**: 139-146.
- COLDITZ, I. G., and WATSON, D. L., 1985:**  
The immunophysiological basis for vaccinating ruminants against mastitis.  
Aust. Vet. J. **62**: 145-153.
- COLMAN, G., 1988:**  
Typing of *Streptococcus agalactiae* (Lancefield group B).  
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **7**: 226-231.
- COMBE, M.-L., LEMELAND, J.-F., PESTEL-CARON, M., and PONS, J.-L., 2000:**  
Multilocus enzyme analysis in aerobic and anaerobic bacteria using gel electrophoresis-nitrocellulose blotting.  
FEMS Microbiol. Let. **185**: 169-174.
- CONRAD, G., PODBIELSKI, A., and LÜTTICKEN, R., 1991:**  
Molecular cloning and nucleotide sequence of the group B streptococcal hemolysin.  
Zbl. Bakt. **275**: 179-184.
- COOPER, B. W., and MORGANELLI, E., 1998:**  
Group B streptococcal bacteremia in adults at Hartford Hospital 1991-1996.  
Conn. Med. **62**: 515-517.
- CURTIS, S. N., and KRAUSE, R. M., 1964:**  
Identification of rhamnose as an antigenic determinant of group B streptococcal carbohydrate.  
Fed. Proc. **23**: 191-193.
- DEDIÉ, K. und KIELWEIN, G., 1962:**  
Tierärztliche Lebensmittelüberwachung im Milchtierbestand.  
Tierärztl. Umsch. **17**: 348-350.
- DEDIÉ, K., BOCKEMÜHL, J., KÜHN, H., VOLKMER, K.-J. und WEINKE, T., (Hrsg.), 1993:**  
In: Bakterielle Zoonosen bei Tier und Mensch.  
Ferdinand Enke Verlag Stuttgart: 330-333.
- DENNING, D. W., BAKER, C. J., TROUP, N. J., and TOMPKINS, L. S., 1989:**  
Restriction endonuclease analysis of human and bovine group B streptococci for epidemiologic study.  
J. Clin. Microbiol. **27**: 1352-1356.

**DESLAURIERS, M., and MOUTON, C., 1992:**

Epitope mapping of hemagglutinating adhesion HA-Ag2 of *Bacteroides (Porphyromonas) gingivalis*.  
Infect. Immun. **60**: 2791-2799.

**DEVRIESE, L. A., 1991:**

A review. Streptococcal ecovars associated with different animal species: epidemiological significance of serogroups and biotypes.  
J. Appl. Bacteriol. **71**: 478-483.

**DMITRIEV, A., PAK, J.V., SUVOROV, A., and TOTOLIAN, A., 1997:**

Analysis of pathogenic group B streptococci by PFGE.  
Adv. Exp. Med. Biol. **418**: 351-353.

**DMITRIEV, A., SUVOROV, A., and TOTOLIAN, A., 1998:**

Physical and genetic chromosomal maps of *Streptococcus agalactiae*, serotypes II and III; rRNA operon organization.  
FEMS Microbiol. Let. **167**: 33-39.

**DOW, S. W., JONES, R. L., THOMAS, T. N., LINN, K. A., and HAMILTON H. B., 1987:**

Group B streptococcal infection in two cats.  
J. Vet. Med. Assoc. **190**: 71-72.

**DOYLE, R. J., and ROSENBERG, M., 1990:**

Microbial Cell Surface Hydrophobicity.  
In: American Society for Microbiology  
Washington, DC: 1-37.

**DURHAM, D. L., MATTINGLY, S. J., DORAN, T. I., MILLIGAN, T. W., and STRAUSS, D. C., 1981:**

Correlation between the production of extracellular substances by type III group B streptococcal strains and virulence in a mouse model.  
Infect. Immun. **34**: 448-454.

**DURAN-REYNALS, F. , 1942:**

Tissue permeability and spreading factors in infection.  
Bacteriol. Rev. **6**: 197-252.

**EASMON, C. S. F., 1986:**

The carrier state: group B *Streptococcus*.  
J. Antimicrob. Chemother. **18**: A 59-65.

**EDELSTEIN, R. M., and PEGRAM, R. G., 1974:**

Contagious skin necrosis of Somali camels associated with *Streptococcus agalactiae*.  
Trop. Anim. Health Prod. **6**: 255-256.

**EDMONDSON, P.W., 1989:**

An economic justification of "blitz" therapy to eradicate *Streptococcus agalactiae* from a dairy herd.  
Vet. Rec. **125**: 591-593.

**EDWARDS, E. A., and LARSON, G. A., 1974:**

New method of grouping beta-hemolytic streptococci directly on sheep blood agar plates by coagglutination specifically sensitized protein A-containing staphylococci.  
Appl. Microbiol. **28**: 972-976.

**EDWARDS, E. A., NICHOLSON-WELLER, A., BAKER, C. J., and KASPER, D. L., 1980:**

The role of specific antibody in alternative complement pathway mediated opsonophagocytosis of type III, group B *streptococcus*.  
J. Exp. Med. **151**: 1275-1287.

**EDWARDS, M. S., KASPER, D. L., JENNINGS, H. J., BAKER, C. J., and NICHOLSON-WELLER, A., 1982:**

Capsular sialic acid prevents activation of the alternative complement pathway by type III, group B streptococci.  
J. Immunol. **128**: 1278-1283.

- EL KOHYL, A., WANNAMAKER, L. W., and KRAUSE, R. M., 1978:**  
Simplified extraction procedure for serological grouping of beta-hemolytic streptococci.  
*Appl. Microbiol.* **28**: 836-839.
- ELDAR, A., BEJERANO, Y., LIVOFF, A., HOROVITCZ, A., and BERCOVIER, H., 1995:**  
Experimental streptococcal meningoencephalitis in cultured fish.  
*Vet. Microbiol.* **43**: 33-40.
- ELLIOTT, J. A., FACKLAM, R. R., and RICHTER, C. B., 1990:**  
Whole-cell protein patterns of nonhemolytic group B, type Ib, streptococci isolated from humans, mice, cattle, frogs, and fish.  
*J. Clin. Microbiol.* **28**: 627-630.
- ERSKINE, R. J., and EBERHART, R. J., 1990:**  
Herd benefit-to-cost ratio and effects of a bovine mastitis control program that includes blitz treatment of *Streptococcus agalactiae*.  
*J. Am. Vet. Med. Assoc.* **196**: 1230-1235.
- ERSKINE, R. J., BARTLETT, P. C., JOHNSON, G. L., and HALBERT, L. W., 1996:**  
Intramuscular administration of ceftiofur sodium versus intramammary infusion of penicillin / novobiocin for treatment of *Streptococcus agalactiae* mastitis in dairy cows.  
*J. Am. Vet. Med. Assoc.* **208**: 258-260.
- ESTUNINGSIH, S., SOEDARMANTO, I., FINK, K., LÄMMLER, CH., and WIBAWAN, I. W. T., 2002:**  
Studies on *Streptococcus agalactiae* isolated from bovine mastitis in Indonesia.  
*J. Vet. Med.* **49**: 185-187.
- FACKLAM, R. R., 1976:**  
A review of the microbiological techniques for the isolation and identification of streptococci.  
*Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **6**: 287-317.
- FARLEY, M. M., HARVEY, R. C., STULL, T., SMITH, J. D., SCHUCHAT, A., WEGNER, J. D., and STEPHENS, D. S., 1993:**  
A population-based assessment of invasive disease due to group B *Streptococcus* in nonpregnant adults.  
*N. Engl. J. Med.* **328**: 1807-1811.
- FARLEY, M. M., 2001:**  
Group B streptococcal disease in nonpregnant adults.  
*Clin. Infect. Dis.* **33**: 556-561.
- FASOLA, E., LIVDAHL, C., and FERRIERI, P., 1993:**  
Molecular analysis of multiple isolates of the major serotypes of group B streptococci.  
*J. Clin. Microbiol.* **31**: 2616-2620.
- FELDMAN, R. G., RIJKERS, G., T., HAMEL, M. E., DAVID, S., and ZEGERS, B. J. M., 1998:**  
The group B streptococcal capsular carbohydrate: immune response and molecular mimicry.  
*Adv. Exp. Med. Biol.* **435**: 261-269.
- FERRIERI, P., CHO, D. S., LIVDAHL, C., RUBENS, C., and FLORES, A. E., 1997:**  
DNA restriction profiles of nontypable group B streptococcal clinical isolates.  
*Adv. Exp. Med. Biol.* **418**: 343-346.
- FERRIERI, P., and FLORES, A. E., 1997:**  
Surface protein expression in group B streptococcal invasive isolates.  
*Adv. Exp. Med. Biol.* **418**: 635-637.
- FIGURA, N., and GUGLIEMETTI, P., 1987:**  
Differentiation of mobile and mesophilic *Aeromonas* strains into species by testing for a CAMP-like factor.  
*J. Clin. Microbiol.* **25**: 1341-1342.

**FINCH, L. A., and MARTIN, D. R., 1984:**

Human and bovine group B streptococci: two distinct populations.  
J. Appl. Bacteriol. **57**: 273-278.

**FINK, K., LÄMMLER, CH. und YOUNAN, M., 2000:**

Identifizierung und weitergehende Charakterisierung von *Streptococcus agalactiae*, isoliert von Mastitiden und von weiteren Infektionen des Kamels (*Camelus dromedarius*).  
41. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene vom 25.09.-28.09.2000 in Garmisch-Partenkirchen. Tagungsbericht: 713-718.

**FLORES, A. E., and FERRIERI, P., 1993:**

Characterization of trypsin resistant proteins of group B streptococci (GBS).  
XII. Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases, 6. -10. 9. 1993 St. Petersburg, Russia.

**FLORES, A. E., and FERRIERI, P., 1996:**

Molecular diversity among the trypsin resistant surface proteins of group B streptococci.  
Zbl. Bakt. **285**: 44-51.

**FORNINI, Q., 1958:**

*Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* und *Streptococcus uberis* in Rinder- und Schweinetonsillen.  
Vet. Ital. **2**: 201-206.

**FORMAN, P., TILSALA-TIMISJÄRVI, A., and ALATOSSAVA, T., 1997:**

Identification of staphylococcal and streptococcal causes of bovine mastitis using 16S-23S rRNA spacer regions.  
Microbiol. **143**: 3491-3500.

**FOX, L. K., and GAY, J. M., 1993:**

Contagious mastitis.  
Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract. **9**: 475-487.

**FRANK, L., 1876:**

Zeitschr. Tiermed. vgl. Pathol. **2**: 456.  
zitiert nach MAJERT, 1931.

**FRASER, G., 1961:**

Hemolytic activity of *Corynebacterium ovis*.  
Nature **189**: 246.

**FRASER, G., 1962:**

The hemolysis of animal erythrocytes by *Pasteurella haemolytica* produced in conjunction with certain staphylococcal toxins.  
Res. Vet. Sci. **3**: 104-110.

**FREY, J., PERRIN, J., and NICOLET, J., 1989:**

Cloning and expression of a cohemolysin, the CAMP factor of *Actinobacillus pleuropneumoniae*.  
Infect. Immun. **57**: 2050-2056.

**FULLER, A. T., 1938:**

The formamide method for the extraction of polysaccharide from haemolytic streptococci.  
B. J. Exp. Pathol. **19**: 130-139.

**FUNK, D. A., FREEMAN, A. E., and BERGER, P. J., 1982:**

Environmental and physiological factors affecting mastitis at drying off and postcalving.  
J. Dairy Sci. **65**: 1258-1268.

**GARCIA, S., COMBALIA, A., and SEGUR, J. M., 1996:**

Septic arthritis of the shoulder due to *Streptococcus agalactiae*.  
Acta Orthop. Belg. **62**: 66-68.

**GARCÍA-MARTÍNEZ, J., ACINAS, S. G., ANTÓN, A. S., and RODRÍGUEZ-VALERA, F., 1999:**

Use of the 16S-23S ribosomal genes spacer region in studies of procaryotic diversity.  
J. Microbiol. Med. **36**: 55-64.

- GARDAM, M. A., LOW, D. E., SAGINUR, R., and MILLER, M. A., 1998:**  
Group B streptococcal necrotizing fasciitis and streptococcal toxic shock-like syndrome in adults.  
Arch. Intern. Med. **158**: 1704-1708.
- GARDINER, K., 1991:**  
Pulsed field gel electrophoresis.  
Analyt. Chem. **63**: 658-665.
- GASE, K., OZEGOWSKI, J., and MALKE, H., 1998:**  
The *Streptococcus agalactiae* *hylB* gene encoding hyaluronate lyase: completion of the sequence and expression analysis.  
Biochim. Biophys. Acta **1398**: 86-98.
- GATTIKER, 1848:**  
Schweiz. Arch. Tierhkl. **10**: 1.  
zitiert nach MAJERT, 1931.
- GEORGE, C. S., 1954:**  
*Streptococcus agalactiae* begleitet von multipler Abszeßbildung bei einem kürzlich eingefangenen Elefanten.  
Ceylon. Vet. J. **2**: 95.
- GERLACH, D. und KÖHLER, W., 1972:**  
Die Bildung und Isolierung von Streptokokken-Hyaluronidase.  
Zbl. Bakt. Hyg. **211**: 166-172.
- GILLESPIE, B. E., JAYARAO, B. M., and OLIVER, S. P., 1997:**  
Identification of *Streptococcus* species by randomly amplified polymorphic desoxyribonucleic acid fingerprinting.  
J. Dairy Sci. **80**: 471-476.
- GOERING, R. V., and TENOVER, F. C., 1997:**  
Epidemiological interpretation of chromosomal macrorestriction fragment patterns analyzed by pulsed-field gel electrophoresis.  
J. Clin. Microbiol. **35**: 2432-2433.
- GOERING, R. V., 1998:**  
The molecular epidemiology of nosocomial infection. An overview of principles, application and interpretation.  
In: Rapid detection of infectious agents. Spencer et al. (eds.)  
Plenum Press, New York: 131-157.
- GÖTZE, R., 1928:**  
Zur Frage der Vorbeuge und Behandlung der Streptokokkenmastitis.  
Berl. Tierärztl. Wschr. **44**: 381.
- GÖTZE, R., 1931:**  
Zur klinischen Diagnostik und Behandlung der Kokkenkrankheiten des Euters.  
Berl. Tierärztl. Wschr. **47**: 649.
- GÖTZE, R., 1950:**  
Zur Bekämpfung der Euterentzündungen des Rindes.  
Vorträge zum Hochschultag der Tierärztlichen Hochschule Hannover.  
Verlag M. & H. Schaper, Hannover.
- GONZÁLEZ, R. N., JASPER, D. E., BUSHNELL, R. B., and FARVER, T. B., 1986:**  
Relationship between mastitis pathogen numbers in bulk tank milk and bovine udder infections in California dairy herds.  
J. Am. Vet. Med. Assoc. **189**: 442-445.
- GOODRUM, K. J., and POULSON-DUNLAP, J., 2002:**  
Cytokine responses to group B streptococci induce nitric oxide production in respiratory epithelial cells.  
Infect. Immun. **70**: 49-54.

- GORDILLO, M. E., SINGH, K. V., BAKER, C. J., and MURRAY, B. E., 1993:**  
 Typing of group B streptococci: comparison of pulsed-field gel electrophoresis and conventional electrophoresis.  
*J. Clin. Microbiol.* **31**: 1430-1434.
- GRANLUND, M., ÖBERG, L., SELLIN, M., and NORGREN, M., 1998:**  
 Identification of a novel insertion element, *IS1548*, in group B streptococci, predominantly in strains causing endocarditis.  
*J. Infect. Dis.* **177**: 967-976.
- GREEN, P. A., KAVINDRA, V. S., MURRAY, B. E., and BAKER, C. J., 1994:**  
 Recurrent group B streptococcal infections in infants: clinical and microbiologic aspects.  
*J. Pediatr.* **125**: 931-938.
- GREILING, H., STUHLSATZ, H. W., EBERHARD, T., and EBERHARD, A., 1975:**  
 Studies on the mechanism of hyaluronate lyase action.  
*Connect Tissue Res.* **3**: 135-139.
- GROMMERS, F. J., van de GEER, D., and in't VEEN, C. A. A., 1985:**  
 Duration of bovine intramammary infections in commercial dairy herds.  
*Vet. Rec.* **116**: 581-584.
- GROSSENBACHER, E., 1951:**  
 Zur Frage des Vorkommens und der Lebensfähigkeit der Galtstreptokokken außerhalb des Kuheuters.  
 Inauguraldissertation bei der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Bern.
- GROTHUES, D., and TÜMLER, B., 1991:**  
 New approaches in genome analysis by pulsed-field gel electrophoresis application to the analysis of *Pseudomonas* species.  
*Mol. Microbiol.* **5**: 2763-2776.
- GÜNTHER, E., OZEGOWSKI, J. H., and KÖHLER, W., 1996:**  
 Occurrence of extracellular hyaluronic acid and hyaluronatylase in streptococci of groups A, B, C, and G.  
*Zbl. Bakt.* **285**: 64-73.
- GÜRTLER, V., and STANISICH, V. A., 1996:**  
 New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region.  
*Microbiol.* **142**: 3-16.
- GÜRTÜRK, K., and LÄMMLER, CH. 1990:**  
 Purification and partial characterization of a cohaemolysin (CAMP-factor) produced by *Streptococcus canis*.  
*FEMS Microbiol. Immunol.* **64**: 97-102.
- GUILLEBEAU, A., 1890:**  
 Schweiz. landwirtsch. Jahrbuch **4**: 45.  
 zitiert nach MÜLLER, 1987.
- GUPTA, N., and STARK, D. M., 1973:**  
 Lancefield grouping of streptococci isolated from guinea pig mammary gland and milk.  
*Am. J. Vet. Res.* **34**: 1111.
- HAHN, H., HEESCHEN, W., REICHMUTH, J., und TOLLE, A., 1972:**  
 Wechselbeziehungen zwischen Infektionen mit Streptokokken der serologischen Gruppe B bei Mensch und Rind.  
 Fortschritte der Veterinärmedizin, 9. Kongressbericht **17**: 189-197.
- HAHN, H., 1980:**  
 Streptokokken.  
 In: Blobel, H. und Schliesser, T., (Hrsg.)  
 Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren. Band II  
 Gustav Fischer Verlag, Jena.



**HAHN, H., 1981:**

Ergebnisse aus der Streptokokken-Zentrale in Kiel von 1965 bis 1978 – Mastitis-Streptokokken.

Zbl. Bakt. **249**: 323-340.

**HAHN, H., FALKE, D., KAUFMANN, S. H. E. und ULLMANN, U., (Hrsg.), 1999:**

In: Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie.

Springer-Verlag, Berlin, 3. Aufl.: 222.

**HAMANN, J., 1989:**

Faktoren der Genese boviner subklinischer Mastitiden.

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **102**: 342-346.

**HAMANN, J., und KRÖMKER, V., 1999:**

Haltungsbedingungen und Milchmengenleistung als mastitisprädisponierende Faktoren.

Tagung des Arbeitskreises „Eutergesundheit“ der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e. V. vom 27.-28.05.1999 in Hannover, Tagungsbericht: 2-13.

**HARDIE, J. M., 1986:**

Genus *Streptococcus* Rosenbach 1884.

In: Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., and Holt, J. G. (eds.)

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.

Williams & Wilkins, Baltimore, USA, Vol. 2: 1047-1063.

**HARDIE, J. M., and WHILEY, R. A., 1997:**

Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*.

J. Appl. Microbiol. Sympos. Suppl. **83**: 1S-11S.

**HARRISON, L. H., ALI, A., DWYER, D. M., LIBONATI, J. P., REEVES, M. W., ELLIOTT, J. A., BILLMANN, L., LASHKERWALA, T., and JOHNSON, J. A., 1995:**

Relapsing invasive group B streptococcal infection in adults.

Ann. Intern. Med. **123**: 421-427.

**HARRISON, L. H., ELLIOTT, J. A., DWYER, D. M., LIBONATI, J. P., FERRIERI, P., BILLMANN, L., and SCHUCHAT, A., 1999:**

Serotype distribution of invasive group B streptococcal isolates in Maryland: implications for vaccine formulation. Maryland Emerging Infections Program.

J. Infect. Dis. **177**: 998-1002.

**HASSAN, A. A., ABDULMAWJOOD, A., YILDIRIM, A. Ö., FINK, K., LÄMMLER, CH., and SCHLENSTEDT, R., 2000:**

Comparative studies on *cfb* gene and other CAMP-factor genes of streptococci isolated from various sources.

Can. J. Microbiol. **46**: 946-951.

**HASSAN, A. A., KHAN, I. U., ABDULMAWJOOD, A., and LÄMMLER, C., 2001:**

Evaluation of PCR methods for rapid identification and differentiation of *Streptococcus uberis* and *Streptococcus agalactiae*.

J. Clin. Microbiol. **39**: 1618-1621.

**HASTY, D. L., JONES, K. R., TOBIAN, J. A., LEBLANC, D. J., and MARCINA, F. L., 1992:**

Multiple adhesins of streptococci.

Infect. Immun. **45**: 13-17.

**HAUGE, M., JESPERGAARD, C., POULSEN, K., and KILIAN, M., 1996:**

Population structure of *Streptococcus agalactiae* reveals an association between specific evolutionary lineages and putative virulence factors but not disease.

Infect. Immun. **64**: 919-925.

**HÉBERT, G. A., and HANCOCK, G. A., 1985:**

Synergistic hemolysis exhibited by species of staphylococci.

J. Clin. Microbiol. **22**: 409-415.

**HEESCHEN, W., TOLLE, A. und ZEIDLER, H., 1967:**

Zur Klassifizierung der Gattung *Streptococcus*.

Zbl. Bakt. **205**: 250-259.

**HEESCHEN, W., 1994:**

In: Wendt, K., Bostedt, H., Mielke, H. und Fuchs, H.-W. (Hrsg.)

Euter- und Gesäugekrankheiten.

Gustav Fischer Verlag, Jena / Stuttgart: 145-146.

**HEESCHEN, W., 1996:**

Einfluss von Eutererkrankungen (Mastitiden) auf die Qualität und hygienische Beschaffenheit von Milch.

Prakt. Tierarzt 77: 223-228.

**HEJLICEK, K., 1994:**

Mastitis durch *Streptococcus agalactiae* (Gelber Galt).

In: Wendt, K., Bostedt, H., Mielke, H. und Fuchs, H.-W. (Hrsg.)

Euter- und Gesäugekrankheiten.

Gustav Fischer Verlag, Jena / Stuttgart: 332-346.

**HENRICHSEN, J., FERRIERI, P., JELINKOVA, J., KÖHLER, W., and MAXTED, W. R., 1984:**

Nomenclature of antigens of group B streptococci.

Int. J. Syst. Bacteriol. 34: 500.

**HESS, E. et BORGEAUD, A., 1889:**

Schweiz. Arch. Tierhkl. 30: 157.

zitiert nach MÜLLER, 1987.

**HICKMAN, M. E., RENCH, M. A., FERRIERI, P., and BAKER, C. J., 1999:**

Changing epidemiology of group B streptococcal colonization.

Pediatr. 104: 203-209.

**HOFFMANN, H., 1991:**

Impfstoffe und Impfstoffherstellung (*Streptococcus agalactiae*).

In: Blobel, H. und Schließer, T. (Hrsg.)

Bakterielle Infektionen bei Tieren. Band I

Gustav Fischer Verlag, Jena, 2. Auflage: 484-486.

**HOFFMANN, R., 1972:**

Untersuchungen über Vorkommen und Bedeutung von Streptokokken unterschiedlicher serologischer Gruppen in Milch.

Monatsh. Vet. Med. 27: 472-474.

**HOLT, J. G., KRIEG, N. R., SNEATH, P. H. A., STALEY, J. T. and WILLIAMS, S. T., 1994:**

In: Hensyl, W. R. (ed.)

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.

Williams & Wilkins, Baltimore, USA, 9<sup>th</sup> edition.

**HOMMEZ, J., DEVRIESE, L. A., CASTRYCK, F., and MIRY, C., 1991:**

Beta-hemolytic streptococci from pigs: bacteriological diagnosis.

J. Vet. Med. 37: 441-444.

**HOSCHUTZKY, H., NIMMICH, W., LOTTSPEICH, F., and JANN, K., 1989:**

Isolation and characterization of the non-fimbrial adhesin NFA-4 from uropathogenic *Escherichia coli* O7:K98:H6.

Microb. Pathog. 6: 351-359.

**HOWELL, D. G., PATTISON, I. H., HOLMAN, H. H., and SMITH, I. M., 1954:**

Experimental streptococcal mastitis: IX. The disease in the cow.

J. Comp. Path. 64: 335-350.

**HUET, H., MARTIN, C., GESLIN, P., GRIMONT, F., and QUENTIN, R., 1993:**

Ribotyping of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from vaginas of asymptomatic women.

Res. Microbiol. 144: 457-465.

**HWANG, M.-N., and EDERER, G. M., 1975:**

Rapid hippurate hydrolysis method for presumptive identification of group B streptococci.

J. Clin. Microbiol. 1: 114-115.

- HYNES, W. L., and WALTON S. L., 2000:**  
Hyaluronidases of gram-positive bacteria.  
FEMS Microbiol. Lett. **183**: 201-207.
- INGALLS, W. L., and JOHNSON, E. B., 1947:**  
Am. J. Vet. Res., Vol. VIII, **29**  
zitiert nach GROSSENBACHER, 1951.
- JAYARAO, B. M., DORÉ, J. J. E., and OLIVER, S. P., 1992:**  
Restriction fragment length polymorphism analysis of 16S ribosomal DNA of *Streptococcus* and *Enterococcus* species of bovine origin.  
J. Clin. Microbiol. **30**: 2235-2240.
- JELÍNKOVÁ, J. und HEESCHEN, W., 1969:**  
B-Streptokokken bei Menschen und Rind. I. Mitteilung: Ergebnisse der serologischen Typisierung.  
Zbl. Bakt. **209**: 315-324.
- JELÍNKOVÁ, J., 1977:**  
Group B streptococci in the human population.  
Curr. Top. Microbiol. Immunol. **76**: 127-165.
- JELÍNKOVÁ, J., and MOTLOVÁ, J., 1985:**  
Worldwide distribution of two new serotypes of group B streptococci: type IV and provisional type V.  
J. Clin. Microbiol. **21**: 361-362.
- JENNINGS, H. J., KATZENELLENBOGEN, E., LUGOWSKI, C., and KASPER, D. L., 1983:**  
Structure of native polysaccharide antigens of type Ia and Ib group B *Streptococcus*.  
Biochem. **22**: 1258.
- JENNINGS, H. J., KATZENELLENBOGEN, E., LUGOWSKI, C., MICHON, F., ROY, R., and KASPER, D. L., 1984:**  
Structure, conformation and immunology of sialic acid-containing polysaccharides of human pathogenic bacteria.  
Pure Appl. Chem. **56**: 893-905.
- JENSEN, M. A., WEBSTER, J. A., and STRAUS, N., 1993:**  
Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction- amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms.  
Appl. Environ. Microbiol. **59**: 945-952.
- JENSEN, N. E., 1980a:**  
Herd types of group B streptococci: Their prevalence among herds in four danish mastitis control areas and the relation of type to the spread within herds.  
Acta Vet. Scand. **21**: 633-639.
- JENSEN, N. E., 1980b:**  
Variation of type antigens of group B streptococci: III. Variation of the protein antigen Ibc.  
Acta Vet. Scand. **21**: 625-632.
- JENSEN, N. E., 1982a:**  
Experimental bovine group B streptococcal mastitis induced by strains of human and bovine origin.  
Nord. Veterinaarmed. **34**: 141-150.
- JENSEN, N. E., 1982b:**  
Distribution of serotypes of group B streptococci in herds and cows within an area of Denmark.  
Acta. Vet. Scand. **21**: 354-366.
- JENSEN, N. E., and AARESTRUP, F. M., 1996:**  
Epidemiological aspects of group B streptococci of bovine and human origin.  
Epidemiol. Infect. **117**: 417-422.

- JERLSTRÖM, P. G., TALAY, S. R., VALENTIN-WEIGAND, P., TIMMIS, K. N., and CHHATWAL, G. S., 1996:**  
Identification of an immunoglobulin A binding motif located in the beta-antigen of the c protein complex of group B streptococci.  
*Infect. Immun.* **64**: 2787-2793.
- JONES, F. S., 1918:**  
Exp. Med. **28**: 735.  
zitiert nach GROSSENbacher, 1951.
- JOHNSON, P., and FERRIERI, P., 1984:**  
Group B streptococcal Ibc protein antigen: Distribution of two determinants in wild-type strains of common serotypes.  
*J. Clin. Microbiol.* **19**: 506-510.
- JONSSON, P., and WADSTRÖM, T., 1984:**  
Cell surface hydrophobicity of *Staphylococcus aureus* measured by the salt aggregation test (SAT).  
*Curr. Microbiol.* **10**: 203-210.
- JÜRGENS, D., SHALABY, F. Y. Y. I., and FEHRENBACH, F. J., 1985:**  
Purification and characterization of CAMP-factor from *Streptococcus agalactiae* by hydrophobic interaction chromatography and chromatofocusing.  
*J. Chromatogr.* **348**: 363-370.
- KÄSTLI, P., 1949:**  
Die Bekämpfung der Streptokokkenmastitis durch die Kontrollorgane der schweizerischen Milchwirtschaft.  
12. Internationaler Milchwirtschaftskongreß, Stockholm.
- KARLSON, P., 1984:**  
Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler.  
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 12. Auflage: 225.
- KE, D., MENARD, C., PICARD, F. J., BOISSINOT, M., OUELLETTE, M., ROY, P. H., and BERGERON, M. G., 2000:**  
Development of conventional and real-time PCR assays for the rapid detection of group B streptococci.  
*Clin. Chem.* **46**: 324-331.
- KEEFE, G. P., 1997:**  
*Streptococcus agalactiae* mastitis: a review.  
*Can. Vet. J.* **38**: 429-437.
- KEEFE, G. P., DOHOO, I. R., and SPANGLER, E., 1997:**  
Herd prevalence and incidence of *Streptococcus agalactiae* in the dairy industry of Prince Edward Island.  
*J. Dairy Sci.* **80**: 464-470.
- KEXEL, G., 1965:**  
Über das Vorkommen der B-Streptokokken beim Menschen.  
*Zbl. Hyg. Infekt.* **151**: 336-348.
- KHAN, I., HASSAN, A. A., ABDULMAWJOOD, A., LÄMMLER, CH., WOLTER, W., and ZSCHÖCK, M., 2000:**  
Identification and further characterization of *Streptococcus uberis* and *Streptococcus parauberis* isolated from bovine milk samples by molecular methods.  
41. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene vom 25.09.-28.09.2000 in Garmisch-Partenkirchen. Tagungsbericht: 406-411.
- KIELWEIN, G., 1994:**  
In: Kielwein, G. (Hrsg.)  
Leitfaden der Milchkunde und Milchhygiene.  
Blackwell Wissenschaftsverlag, Berlin: 100.
- KILLIAN, M., 1976:**  
The hemolytic activity of *Haemophilus* species.  
*Acta. Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* **84**: 339-341.

**KIM, K. S., 1987:**

Efficacy of human immunoglobulin and penicillin G in treatment of experimental group B streptococcal infection.  
Pediatr. Res. **21**: 289-292.

**KIRCHER, S. M., MEYER, M. P., and JORDAN, J. A., 1996:**

Comparison of a modified DNA hybridization assay with standard culture enrichment for detecting group B streptococci in obstetric patients.  
J. Clin. Microbiol. **34**: 342-344.

**KIRKEGAARD, M. K., and FIELD, C. R., 1977:**

Rapid slide coagulation test for identifying and typing group B streptococci.  
J. Clin. Microbiol. **6**: 266-270.

**KITT, 1893:**

In: Bakterienkunde, Wien: 322.  
zitiert nach URBASCHEK, 1951.

**KJEMS, E., PERCH, B., and HENRICHSEN, J., 1980:**

Serotypes of group B streptococci and their relation to hyaluronidase production and hydrolysis of salicin.  
J. Clin. Microbiol. **11**: 111-113.

**KLEIN, L. A., KLECKNER, A. L., and SCHEIDY, 1938:**

Univ. Penn. Vet. Ext. Quart. **70**: 3.  
zitiert nach GROSSENBACHER, 1951.

**KLEINSCHROTH, E., RABOLD, K. und DENEKE, J., 1994:**

Mastitis - Eutererkrankungen erkennen, vorbeugen und behandeln.  
In: top agrar - Das Magazin für moderne Landwirtschaft.  
Landwirtschaftsverlag GmbH, Münster.

**KLIMMER, M. und HAUPT, H., 1933:**

Kann der gelbe Galt durch das Melken auf gesunde Kühe übertragen werden?  
Tierärztl. Rdsch. **39**: 91.

**KLOPPERT, B., WOLTER, W., RIBE, K. und ZSCHÖCK, M., 1999:**

Erregerspektrum bei boviner subklinischer Mastitis des Rindes in hessischen Milcherzeugerbetrieben.  
Tagungsbericht des 23. Kongresses der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e. V. in Bad Nauheim vom 13.-16.04.1999: 350-355.

**KO, W. C., LEE, H. C., WANG, L. R., LEE, C. T., LIU, A. J., and WU, J. J., 2001:**

Serotyping and antimicrobial susceptibility of group B *Streptococcus* over an eight-year period in Southern Taiwan.  
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **20**: 334-339.

**KÖHLER, W., 1988:**

CAMP-like phenomena of Vibrios.  
Zbl. Bakt. Hyg. **270**: 35-40.

**KONG, F., GOWAN, S., MARTIN, D., JAMES, G., and GILBERT, G. L., 2002:**

Serotype identification of group B streptococci by PCR and sequencing.  
J. Clin. Microbiol. **40**: 216-226.

**KORNBLATT, A. N., ADAMS, R. L., BARTHOLD, S. W., and CAMERON, G. A., 1983:**

Canine neonatal deaths associated with group B streptococcal septicemia.  
J. Am. Vet. Med. Assoc. **183**: 700-701.

**KOSTMAN, J. R., ALDEN, M. B., MAIR, M., EDLIND, T. D., LIPUMA, J. J., and STULL, T. L., 1995:**

A universal approach to bacterial molecular epidemiology by polymerase chain reaction ribotyping.  
J. Infect. Dis. **171**: 204-208.

**KRABISCH, P., GANGL, A., WITTKOWSKI, G. und FEHLINGS, K., 1999:**

Mastitiserreger – Resistenzsituation bei veterinär- und humanmedizinisch relevanten Antibiotika.

Tagungsbericht des 23. Kongresses der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e. V. vom 13.-16.04.1999 in Bad Nauheim: 145-155.

**KRÖMKER, V., 1999:**

Zum Trockenstellen unter antibiotischem Schutz.

Tagungsbericht des Arbeitskreises „Eutergesundheit“ der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e. V. vom 27.-28.05.1999 in Hannover: 118-128.

**KRÜGER, W., 1958a:**

Das Problem Galt. 1. Allgemeines zur Frage des Bestehens einer erblich bedingten Resistenz bzw. Anfälligkeit gegenüber der Infektion mit Mastitisstreptokokken.

Kieler Milchwirtschaftl. Forsch. **5**:

zitiert nach BUSEMAN, 1964.

**KRÜGER, W., 1958b:**

Wirksame Galtbekämpfung durch Zuchtwahl und zweckmäßige Kälberaufzucht.

Kieler Milchwirtschaftl. Forsch. **5**:

zitiert nach BUSEMAN, 1964.

**KUMMENEJE, K., NESBAKKEN, T., and MIKKELSEN, T., 1985:**

*Streptococcus agalactiae* infection in a hamster.

Acta Vet. Scand. **16**: 554-556.

**KURL, D. N., HAATAJA, S., and FINNE, J., 1989:**

Hemagglutination activities of group B, C, D, and G streptococci: demonstration of novel sugar-specific cell-binding activities in *Streptococcus suis*.

Infect. Immun. **57** : 384-389.

**KWAM, A. I., BEVANGER, L., and IVERSEN, O. J., 1993:**

Characterization of a surface protein of group B streptococci resembling the  $\alpha$  antigen of the c protein.

XII. Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases, 6.-10.9.1993 St. Petersburg, Russia.

**LÄMMLER, CH., PASARIBU, F. H., and BLOBEL, H., 1984:**

Early recognition of the CAMP-reactivity in group B streptococci.

Zbl. Bakt. Hyg. **258**: 183-186.

**LÄMMLER, CH., FREDE, C., and BLOBEL, H., 1986:**

Effective murolytic solubilization of streptococcal-group-specific antigen.

J. Clin. Microbiol. **24**: 903-904.

**LÄMMLER, CH. und BLOBEL, H., 1987a:**

Streptokokken der serologischen Gruppe B von Mensch und Rind.

Tierärztl. Umsch. **2**: 148-152.

**LÄMMLER, CH. und BLOBEL, H., 1987b:**

Synergistische und antagonistische Hämolytische Reaktionen bakterieller Proteine.

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **100**: 95-99.

**LÄMMLER, CH., GÜRTÜRK, K., and BLOBEL, H., 1987a:**

CAMP-like reactions of group G streptococci from dogs.

Med. Sci. Res. **15**: 217-218.

**LÄMMLER, CH., GÜRTÜRK, K., and BLOBEL, H., 1987b:**

Streptococcal group B type antigen X in group L streptococci.

J. Clin. Microbiol. **25**: 1803-1804.

**LÄMMLER, CH., and WIBAWAN, I. W. T., 1990:**

Solubilization of group-and type-specific streptococcal antigens with a murolytic enzyme from *Staphylococcus hyicus*.

J. Vet. Med. **37**: 173-176.

- LÄMMLER, CH., WIBAWAN, I. W. T., PASARIBU, F. H. und WARSA, U. CH., 1993a:**  
Vergleichende Untersuchungen von Streptokokken der serologischen Gruppe B, isoliert aus Untersuchungsmaterial von Rind und Mensch in Deutschland und Indonesien.  
Tierärztl. Umsch. **48**: 171-175.
- LÄMMLER, CH., WIBAWAN, I. W. T., SCHÖTT, S. und KIELWEIN, G., 1993b:**  
Serotypisierung und weitergehende Charakterisierung von Streptokokken der serologischen Gruppe B (*Streptococcus agalactiae*), isoliert von Rindermastitiden in Thüringen und Hessen.  
Monatsh. Vet. Med. **48**: 645-650.
- LÄMMLER, CH. und HAHN, G., 1994:**  
Streptokokken  
In: Blobel, H. und Schließer, T. (Hrsg.)  
Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren.  
Band II/2: Streptokokken-Infektionen und Rotlauf.  
Gustav Fischer Verlag, Jena / Stuttgart, 2. Auflage: 27-79.
- LÄMMLER, CH., 1995:**  
Grouping and typing streptococci of serological group B by latex agglutination.  
Med. Sci. Res. **23**: 259-260.
- LÄMMLER, CH., SCHWARZ, S., WIBAWAN, I. W. T., OTT, E., BOPP, V., and MARTINEZ-TAGLE, A., 1995:**  
Comparison of streptococci of serological group B isolated from healthy carriers and active diseases in Chile.  
J. Med. Microbiol. **42**: 161-164.
- LÄMMLER, CH., ABDULMAWJOOD, A., and WEIB, R., 1998a:**  
Properties of serological group B streptococci of dog, cat and monkey origin.  
J. Vet. Med. **45**: 561-566.
- LÄMMLER, CH., CIRAK, N., and SMOLA, J., 1998b:**  
Studies on biochemical, serological and further characteristics of *Streptococcus porcinus*.  
J. Vet. Med. **45**: 235-243.
- LÄMMLER, CH., ABDULMAWJOOD, A., HASSAN, A. A., ESTOEPANGESTIE, S. und ANNEMÜLLER, C. 1998c:**  
Identifizierung von Erregern boviner Mastitiden durch Beurteilung speziesspezifischer Genabschnitte der ribosomalen RNA.  
39. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes „Lebensmittelhygiene“ der DVG vom 22.09.-25.09.1998 in Garmisch-Partenkirchen, Tagungsbericht: 240-245.
- LANCEFIELD, R. C., 1925a:**  
The immunological relationships of *Streptococcus viridans* and certain of its chemical fractions. I. Serological reactions obtained with anti-bacterial sera.  
J. Exp. Med. **42**: 377.
- LANCEFIELD, R. C., 1925b:**  
The immunological relationships of *Streptococcus viridans* and certain of its chemical fractions. II. Serological reactions obtained with anti-nucleoprotein sera.  
J. Exp. Med. **42**: 397.
- LANCEFIELD, R. C., 1933:**  
A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci.  
J. Exp. Med. **57**: 571-595.
- LANCEFIELD, R. C., 1934:**  
A serological differentiation of specific types of bovine hemolytic streptococci (group B).  
J. Exp. Med. **59**: 441-458.
- LANCEFIELD, R. C., and HARE, R., 1935:**  
The serological differentiation of pathogenic and non-pathogenic streptococci from parturient women.  
J. Exp. Med. **61**: 335.

**LANCEFIELD, R. C., 1938a:**

Two serological types of group B hemolytic streptococci with related, but not identical, type-specific substances.

J. Exp. Med. **67**: 25-40.

**LANCEFIELD, R. C., 1938b:**

A micro-precipitin-technique for classifying hemolytic streptococci, improved methods for producing antisera.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **38**: 473-478.

**LANCEFIELD, R. C., and PERLMAN, G. R., 1952:**

Preparation and properties of a protein (R antigen) occurring in streptococci of group A, type 28 and in certain streptococci of other serological groups.

J. Exp. Med. **96**: 83.

**LANCEFIELD, R. C., and FREIMER, E. H., 1966:**

Type-specific polysaccharide antigens of group B streptococci.

J. Hyg. **64**: 191-203.

**LECLERCQ, R., and COURVALIN, P., 1991a:**

Intrinsic and unusual resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotics in bacteria.

Antimicrob. Agents Chemother. **35**: 12670-12672.

**LECLERCQ, R., and COURVALIN, P., 1991b:**

Bacterial resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotics by target modification.

Antimicrob. Agents Chemother. **35**: 12673-12676.

**LEHMANN, K. B. und NEUMANN, R., 1896:**

Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speziellen bakteriologischen Diagnostik.

Verlag Lehmann, München.

**LEWIN, E. B., and AMSTEY, M. S., 1981:**

Natural history of group B *streptococcus* colonization and its therapy during pregnancy.

Am. J. Obstet. Gynecol. **139**: 512-515.

**LI, J., KASPER, D. L., AUSUBEL, F. M., ROSNER, B., and MICHEL, J. L., 1997:**

Inactivation of the  $\alpha$  C protein antigen gene, *bca*, by a novel shuttle / suicide vector results in attenuation of virulence and immunity in group B Streptococcus.

Proc. Natl. Acad. Sci. **94**: 13251-13256.

**LIN, B., HOLLINGSHEAD, S. K., COLIGAN, J. E., EGAN, M. L., BAKER, J. R., and PRITCHARD, D. G., 1994:**

Cloning and expression of the gene for group B streptococcal hyaluronate lyase.

J. Biol. Chem. **269**: 30113-30116.

**LIN, F. Y. C., CLEMENS, J. D., AZIMI, P. H., REGAN, J. A., WEISMAN, L. E., PHILIPS, J. B. 3rd, RHOADS, G. G., CLARK, P., BRENNER, R. A., and FERRIERI, P., 1998:**

Capsular polysaccharide types of group B streptococcal isolates from neonates with early-onset systemic infection.

J. Infect. Dis. **177**: 790-792.

**LINDBERG, J. A., 1998:**

Endocarditis and normal cell meningitis caused by group B streptococci.

Ugeskr. Laeger. **160**: 6354-6355.

**LINDÉN, V., 1983:**

Mouse-protective effect of rabbit anti-R-protein antibodies against group B streptococci type II carrying R-protein. Lack of effect on type III carrying R-protein.

Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand. **91**: 145-151.

**LINDÉN, V., CHRISTENSEN, K. K., and CHRISTENSEN, P., 1983:**

The occurrence of R-protein among isolates of group B streptococci from human sources.

Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand. **91**: 153-156.



**LITTLE, 1938:**

The significance of human double-zone beta-hemolytic streptococci in the udder of the cow.

J. Exp. Med. **68**: 905.

**LÖGERING, H. J., 1981:**

Vergleichende Untersuchung fünf verschiedener Methoden zur Gruppenbestimmung von  $\beta$ -hämolisierenden Streptokokken.

Zbl. Bakt. **248**: 437-445.

**LOPES, M. F., MERQUINOR, V. L. C., PERALTA, J. M., and TEIXEIRA, L. M., 1995:**

Partial characterization of the cohemolytic factor produced by *Streptococcus uberis* and comparison with the CAMP-factor.

FEMS Immunol. Microbiol. **12**: 205-211.

**LOTTHAMMER, K.-H., 1999:**

Empfehlungen zum Verfahren des Trockenstellens. Zum Trockenstellen unter antibiotischem Schutz.

Tagungsbericht des Arbeitskreises „Eutergesundheit“ der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e. V. vom 27.-28.05.1999 in Hannover: 129-131.

**LOTZ-NOLAN, L., AMATO, T., ILTIS, J., WALLEN, W., and PACKER, B., 1989:**

Evaluation of a rapid latex agglutination test for detection of group B streptococci in vaginal specimens.

Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **8**: 289-293.

**LUDOWIEG, J., VENNESLAND, B., and DORFMAN, A., 1961:**

The mechanism of action of hyaluronidases.

J. Biol. Chem. **236**: 333-339.

**LÜTTICKEN, R., STERNSCHULTE, W., GÜNTHER, H., EIBACH, H. W. und BOLTE, A., 1983:**

Neugeborenenensepsis und - meningitis durch Gruppe B-Streptokokken.

Dtsch. Ärztebl. **18**: 1-5.

**LÜTTICKEN, R., SCHNEEWIND, O., SCHMIDT, A., and MÜHLEN-BROCK, E., 1988:**

Cloning of the genetic determinant of the group B streptococcal hemolysin in *E. coli*.

In: FEHRENBACH et al. (Hrsg.)

Bacterial protein toxins.

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart / New York.

**LYON, B. R., and SKURRAY, R. A., 1987:**

Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic basis.

Microbiol. Rev. **51**: 88-134.

**MAELAND, J. A., BRAKSTAD, O. G., BEVANGER, L., and KVAM, A. I., 1997:**

*Streptococcus agalactiae*  $\beta$  gene and gene product variations.

J. Med. Microbiol. **46**: 999-1005.

**MAELAND, J. A., BRAKSTAD, O. G., BEVANGER, L., IVERSEN, G., and LYG, R. V., 1999:**

*bca*, beta gene, and gene product divergency in reference and prototype strains of *Streptococcus agalactiae*.

Clin. Diagn. Lab. Immunol. **6**: 986-988.

**MAELAND, J. A., BRAKSTAD, O. G., BEVANGER, L., and KROKSTAD, S., 2000:**

Distribution and expression of *bca*, the gene encoding the c alpha protein, by *Streptococcus agalactiae*.

J. Med. Microbiol. **49**: 193-198.

**MAJERT, H., 1931:**

Ein Beitrag zur Diagnose, Ätiologie und Therapie der Galt-Streptokokken-Mastitis.

Inauguraldissertation bei der Veterinärmedizinischen Fakultät der Hessischen Ludwigs-Universität zu Gießen.

**MANIATIS, A. N., PALERMOS, J., KANTZANOU, M., MANIATIS, N. A., CHRISTODOULOU, C., and LEGAKIS, N. J., 1996:**

*Streptococcus agalactiae*: a vaginal pathogen?

J. Med. Microbiol. **44**: 199-202.

- MARCHLEWICZ, B. A., and DUNCAN, J. L., 1980:**  
Properties of a hemolysin produced by group B streptococci.  
*Infect. Immun.* **30**: 805-813.
- MARTINEZ, G., HAREL, J., HIGGINS, R., LACOUTURE, S., DAIGNAULT, D., and GOTTSCHALK, M., 2000:**  
Characterization of *Streptococcus agalactiae* isolates from bovine and human origin by randomly amplified polymorphic DNA analysis.  
*J. Clin. Microbiol.* **38**: 71-78.
- MASLOW, J. N., SLUTSKY, A. M., and ARBEIT, R. D., 1993:**  
Application of pulsed-field gel electrophoresis to molecular epidemiology.  
*In*: Persing, D. H., Smith, T. F., Tenover, F. C., and White, T. J. (eds.)  
*Diagnostic Molecular Microbiology*.  
American Society of Microbiology, Washington D. C.: 563-572.
- MATORRAS, R., GARTCIA-PEREA, A., USANIZAGA, J. A., and OMENACA, F., 1989:**  
Natural transmission of group B *Streptococcus* during delivery.  
*Int. J. Gynecol. Obstet.* **30**: 99-103.
- MAWN, J. A., SIMPSON, A. J., and HEARD, S. R., 1993:**  
Detection of the C protein gene among group B streptococci using PCR.  
*J. Clin. Pathol.* **46**: 633-636.
- McCLEAN, D., 1941:**  
The capsulation of streptococci and its relation to diffusion factor (hyaluronidase).  
*J. Pathol. Bacteriol.* **53**: 13-27.
- McDONALD, J. S., 1977:**  
Streptococcal and staphylococcal mastitis.  
*J. Am. Vet. Med. Assoc.* **170**: 1157-1159.
- McKENNA, D. S., and IAMS, J. D., 1998:**  
Group B streptococcal infections.  
*Semin. Perinatol.* **22**: 267-276.
- MERKT, H., 1962:**  
Gedanken zur organisierten Mastitisbekämpfung.  
*Dtsch. Tierärztl. Wschr.* **69**: 505-506.
- MERRITT, K., and JACOBS, N., J., 1976:**  
Improved medium for detection pigment production by group B streptococci.  
*J. Clin. Microbiol.* **4**: 379-380.
- MERRITT, K., and JACOBS, N. J., 1978:**  
Characterization and incidence of pigment production by human clinical group B streptococci.  
*J. Clin. Microbiol.* **8**: 105-107.
- MICHEL, J. L., MADOFF, L. C., KLING, D. E., KASPER, D. L., and AUSUBEL, F. M., 1991:**  
C proteins of group B streptococci.  
*In*: Dunny, G. M., Cleary, P. P., and McKay, L. L. (eds.)  
*Genetics and Molecular Biology of Streptococci, Lactococci, and Enterococci*.  
American Society for Microbiology, Washington D.C.: 214-218.
- MICHON, F., KATZENELLENBOGEN, E., KASPER, D. L., and JENNINGS, H. J., 1987:**  
Structure of the complex group-specific polysaccharide of group B *Streptococcus*.  
*Biochem.* **26**: 476-486.
- MIGULA, 1900:**  
*In*: System der Bakterien.  
zitiert nach MÜLLER, 1987.
- MILLIGAN, T. W., BAKER, C. J., STRAUSS, D. C., and MATTINGLY, S. J., 1978:**  
Association of elevated levels of extracellular neuraminidase with clinical isolates of type III group B streptococci.  
*Infect. Immun.* **21**: 738-746.

- MORRISON, J. R. A., and WRIGHT, C. L., 1984:**  
*Streptococcus agalactiae* serotypes in the south west of Scotland.  
Vet. Res. **115**: 439.
- MOSABI, J. M., ARIMI, S. M., and KANG'ETHE, E. K., 1997:**  
Isolation and characterization of group B streptococci from human and bovine sources within and around Nairobi.  
Epidemiol. Infect. **118**: 215-220.
- MOSCHETTI, G., BLAIOTTA, G., APONTE, M., CATZEDDU, P., VILLANI, F., DEIANA, P., and COPPOLA, S., 1998:**  
Random amplified polymorphic DNA and amplified ribosomal DNA spacer polymorphism: powerful methods to differentiate *Streptococcus thermophilus* strains.  
J. Appl. Microbiol. **85**: 25-36.
- MOTLOVÁ, J., WAGNER, M., and JELÍNKOVÁ, J., 1986:**  
A search for new group B streptococcal serotypes.  
J. Med. Microbiol. **22**: 101-105.
- MOYLETT, E. H., FERNANDEZ, M., RENCH, M. A., HICKMAN, M. E., and BAKER, C. J., 2000:**  
A 5-year review of recurrent group B streptococcal disease: lessons from twin infants.  
Clin. Infect. Dis. **30**: 282-287.
- MÜLLER, G., 1967:**  
Die Typisierung der Streptokokken der Gruppe B. II. Mitteilung: Methoden und Ergebnisse der Typisierung von humanen und bovinen Streptokokken der Gruppe B.  
Arch. Exp. Vet. Med. **21**: 55-64.
- MÜLLER, G., 1987:**  
Streptokokken-Infektionen.  
In: Beer, J. (Hrsg.)  
Infektionskrankheiten der Haustiere. Teil II.  
Gustav Fischer Verlag, Jena, 3. Auflage: 458-482.
- MULLIS, K. B., and FALOONA, F. A., 1987:**  
Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction.  
Methods Enzymol. **155**: 335-350.
- MULLIS, K. B., 1990a:**  
The unusual origin of the polymerase chain reaction.  
Sci. Am. **262**: 56-61, 64-65.
- MULLIS, K. B., 1990b:**  
Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction.  
Ann. Biol. Clin. **48**: 579-582.
- MURAI, T., INAZUMI, Y., SUGIYAMA, M., and NISHIYAMA, Y., 1990:**  
Antigenicity and prevalence of group B *Streptococcus*, type "M9", in Japan.  
XI. Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases, 10.-14. 9. 1990, Siena, Italy.
- MURPHY, J. M., STUART, O. M., and REED, F. J., 1952:**  
An evaluation of the CAMP-test for the identification of *Streptococcus agalactiae* in the routine mastitis testing.  
Cornell Vet. **42**: 133-147.
- MURRA, D., 1957:**  
Über eine neue Form von Mastitis infectiosa et contagiosa der Schafe durch *Sc. agalactiae*.  
Vet. Ital. **8**: 417-430.
- MUSSER, J. M., MATTINGLY, S. J., QUENTIN, R., and GOUDEAU, A., 1989:**  
Identification of a high-virulence clone of type III *Streptococcus agalactiae* (group B *Streptococcus*) causing invasive neonatal disease.  
Proc. Natl. Acad. Sci. **86**: 4731-4735.

- NAGANO, Y., NAGANO, N., TAKAHASHI, S., SUZUKI, A., and OKUWAKI, Y., 1989:**  
Screening of type Ia and Ib *Streptococcus agalactiae* strains with high sialic levels by determination of susceptibility to tetracyclines.  
J. Clin. Microbiol. **27**: 2767-2771.
- NAGANO, Y., NAGANO, N., TAKAHASHI, S., MURONO, K., FUJITA, K., TAGUCHI, F., and OKUWAKI, Y., 1991:**  
Restriction endonuclease digest patterns of chromosomal DNA from group B  $\beta$ -haemolytic streptococci.  
J. Med. Microbiol. **35**: 297-303.
- NASH, D. L., ROGERS, G. W., COOPER, J. B., HARGROVE, G. L., KEOWN, J. F., and HANSEN, L. B., 2000:**  
Heritability of clinical mastitis incidence and relationship with sire transmitting abilities for somatic cell score, udder type traits, productive life, and protein yield.  
J. Dairy Sci. **83**: 2350-2360.
- NICKERSON, S. C., WATTS, J. L., BODDIE, R. L., and PANKEY, J. W., 1986:**  
Evaluation of .5 % and 1 % iodophor teat dips on commercial dairies.  
J. Dairy Sci. **69**: 1693-1698.
- NITSCH, M., 1948:**  
Untersuchungen über die Vererbung der Anlage zu Streptokokkenmastitis und über einige Konstitutionsmerkmale in einer Braunviehherde.  
Züchtungsk. **20**: 118-122.
- NIZET, V., GIBSON, R., CHI, E., FRAMSON, P., HULSE, M., and RUBENS, C., 1996:**  
Group B streptococcal beta-hemolysin expression is associated with injury of lung epithelial cells.  
Infect. Immun. **64**: 3818-3826.
- NIZET, V., KIM, K. S., STINS, M., JONAS, M., CHI, E. Y., NGUYEN, D., and RUBENS, C. E., 1997:**  
Invasion of brain microvascular endothelial cells by group B streptococci.  
Infect. Immun. **65**: 5074-5081.
- NOCARD, E., et MOLLEREAU, A., 1887:**  
Sur une mammite contagieuse des vaches laitières.  
Ann. Inst. Pasteur **1**: 109-126.
- OBIGER, G., 1957:**  
Qualitätsverbesserung der Milch durch Mastitisbekämpfung und hygienische Milchgewinnung.  
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **70**: 21-24.
- OHM, B., 1958:**  
Infektionen des infantilen Rindereuters.  
Inauguraldissertation bei der Veterinärmedizinischen Fakultät der Hessischen Ludwigs-Universität zu Gießen.
- OLTENACU, P. A., and EKESBO, I., 1994:**  
Epidemiological study of clinical mastitis in dairy cattle.  
Vet. Res. **25**: 208-212.
- OUCHTERLONY, O., 1949:**  
Antigen-antibody reactions in gel.  
Acta Pathol. Microbiol. Scand. **26**: 507.
- OZEGOWSKI, J. H., GÜNTHER, E., and REICHARDT, W., 1994:**  
Purification and characterization of hyaluronidase from *Streptococcus agalactiae*.  
Zbl. Bakt. **280**: 497-506.
- PASARIBU, F. H., LÄMMLER, CH., and BLOBEL, H., 1985:**  
Serotyping of bovine and human group B streptococci by coagglutination.  
IRCS Med. Sci. **13**: 24-25.

**PATTISON, I. H., MATTHEWS, P. R. J., and MAXTED, W. R., 1955a:**

Type classification by Lancefield precipitin method of human and bovine group B streptococci isolated in Britain.

J. Pathol. Bacteriol. **69**: 43-50.

**PATTISON, I. H., MATTHEWS, P. R. J., and HOWELL, D. G., 1955b:**

The type classification of group B streptococci, with special reference to bovine strains apparently lacking in type polysaccharide.

J. Pathol. Bacteriol. **69**: 51-60.

**PAULSEN, I. T., BROWN, M. H., and SKURRAY, R. A., 1996:**

Proton-dependent multidrug efflux systems.

Microbiol. Rev. **60**: 575-608.

**PAYNE, N. R., and FERRIERI, P., 1985:**

The relation of the Ibc protein antigen to the opsonization differences between strains of type II group B streptococci.

J. Infect. Dis. **151**: 672-681.

**PERCH, B., KJEMS, E., and HENRICHSEN, J., 1979:**

New serotypes of group B streptococci isolated from human sources.

J. Clin. Microbiol. **10**: 109-110.

**PHUEKTES, P., MANSELL, P. D., and BROWNING, G. F., 2001:**

Multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and streptococcal causes of bovine mastitis.

J. Dairy Sci. **84**: 1140-1148.

**PLASTRIDGE, W. N., 1946:**

In: Little, R. B., and Plastridge, W. N. (eds.)

Bovine mastitis.

Mc Graw-Hill, New York / London.

**PLUMMER, H., 1935:**

J. Bacteriol. **30**: 5.

zitiert nach GROSSENBACHER, 1951.

**PODBIELSKI, A., BLANKENSTEIN, O., and LÜTTICKEN, R., 1994:**

Molecular characterization of the *cfb* gene encoding group B streptococcal CAMP-factor.

Med. Microbiol. Immunol. **183**: 239-256.

**PRITCHARD, D. G., GRAY, B. M., and DILLON, Jr. H. C., 1984:**

Characterization of the group-specific polysaccharide of group B *Streptococcus*.

Arch. Biochem. Biophys. **235**: 385-392.

**PRITCHARD, D. G., and LIN, B., 1993:**

Group B streptococcal neuraminidase is actually a hyaluronidase.

Infect. Immun. **61**: 3234-3239.

**PRITCHARD, D. G., TRENT, J. O., LI, X., ZHANG, P., EGAN, M. L., and BAKER, J. R., 2000:**

Characterization of the active site of group B streptococcal hyaluronate lyase.

Proteins **40**: 126-134.

**QUENTIN, R., HUET, H., WANG, F.-S., GESLIN, P., GOUDEAU, A., and SELANDER, R. K., 1995:**

Characterization of *Streptococcus agalactiae* strains by multilocus enzyme genotype and serotype: identification of multiple virulent clone families that cause invasive neonatal disease.

J. Clin. Microbiol. **33**: 2576-2581.

**QUINTILLIANI, R. Jr., and COURVALIN, P., 1995:**

Mechanism of resistance to antimicrobial agents.

In: Murray, P. R., Baron, E. J., Pfaller, M. A., Tenover, F. C. and Tenover, R. H. (eds.)

Manual of Clinical Microbiology,

ASM, Washington D.C., 6<sup>th</sup> ed.: 1308-1326.

- RAINARD, P., LAUTROU, Y., SARRADIN, P., COULIBALY, A., and POUTREL, B., 1991a:**  
The kinetics of inflammation and phagocytosis during bovine mastitis induced by *Streptococcus agalactiae* bearing the protein X.  
Vet. Res. Comm. **15**: 163-176.
- RAINARD, P., LAUTROU, Y., SARRADIN, P., COULIBALY, A., and POUTREL, B., 1991b:**  
Protein X of *Streptococcus agalactiae* induces opsonic antibodies in cows.  
J. Clin. Microbiol. **29**: 1842-1846.
- RAINARD, P., SARRADIN, P., and POUTREL, B., 1994:**  
Phenotypic variability of X-protein expression by mastitis-causing *Streptococcus agalactiae* of serotype NT/X and opsonic activities of specific antibodies.  
Microb. Pathog. **16**: 359-372.
- RANTZ, L. A., and RANDALL, E., 1955:**  
Use of autoclaved extracts of haemolytic streptococci for serological grouping.  
Stanford Med. Bull. **13**: 290-291.
- RAST, A., 1854:**  
Schweiz. Arch. Tierhkl. **13**: 289.  
zitiert nach MAJERT, 1931.
- REISCHL, U. and WOLF, H., 1998:**  
The use of molecular methods in infectious diseases.  
Biotest Bull. **6**: 3-20.
- RENCH, M. A., and BAKER, C. J., 1989:**  
Group B streptococcal breast abscess in a mother and mastitis in her infant.  
Obstet. Gynecol. **73**: 875-877.
- RIVAS, A. L., GONZALES, R. N., WIEDMANN, M., BRUCE, J. L., COLE, E. M., BENNETT, G. J., SCHULTE, H. F., WILSON, D. J., MOHAMMED, H. O., and BATT, C. A., 1997:**  
Diversity of *Streptococcus agalactiae* and *Staphylococcus aureus* ribotypes recovered from New York dairy herds.  
Am. J. Vet. Res. **58**: 482-487.
- ROBERTS, M. C., 1996:**  
Tetracycline resistance determinants: mechanism of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution.  
FEMS Microbiol. Rev. **19**: 1-24.
- ROBINSON, J. A., and MEYER, F. P., 1966:**  
Streptococcal fish pathogen.  
J. Bacteriol. **92**: 512.
- ROCOURT, J., and GRIMONT, P. A. D., 1983:**  
*Listeria welshimeri* sp. nov. and *Listeria seeligeri* sp. nov.  
Int. J. Syst. Bacteriol. **33**: 866-869.
- RODIG, H., OZEGOWSKI, J. H., PESCHEL, G., and MULLER, P. J., 2000:**  
Complementary characterization of a hyaluronic acid splitting enzyme from *Streptococcus agalactiae*.  
Int. J. Med. Microbiol. Virol. Parasitol. Infect. Dis. **289**: 835-843.
- ROEMER, B. und GRÜN, L., 1949:**  
Präzipitine im Patientenserum bei Streptokokken-Infektionen.  
Zbl. Bakt. **154**: 206-211.
- RÖMLING, U., HEUER, T., and TÜMMLER, B., 1994:**  
Bacterial genome analysis by pulsed-field gel electrophoresis techniques.  
In: Chrambach, A., and Dunn, M. J. (eds.)  
Advances in electrophoresis.  
Vol. VHC, Weinheim 1994: 353-406.

- RÖMLING, U., FISLAGE, R. und TÜMLER, B., 1995:**  
Theorie und Anwendung der Makrorestriktionsanalyse für die klonale Analyse von Erregern.  
Immun. Infekt. **23**: 4-8.
- ROLLAND, K., MAROIS, C., SIQUIER, V., CATTIER, B., and QUENTIN, R., 1999:**  
Genetic features of *Streptococcus agalactiae* strains causing severe neonatal infections, as revealed by pulsed-field gel electrophoresis and *hylB* gene analysis.  
J. Clin. Microbiol. **37**: 1892-1898.
- ROLLE, M. und MAYR, A., (Hrsg.), 1993:**  
In: Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre.  
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 6. Auflage: 33-82, 701-704.
- ROSENBACH, F. J., 1884:**  
Mikroorganismen bei den Wund-Infektions-Krankheiten des Menschen.  
J. F. Bergmann Verlag, Wiesbaden.
- ROSENBERG, M., GUTNICK, M. D., and ROSENBERG, E., 1980:**  
Adherence of bacteria to hydrocarbons: a useful technique for studying cell surface hydrophobicity.  
FEMS Microbiol. Lett. **9**: 29-33.
- ROSS, P. W., 1984:**  
Occasional review: group B *Streptococcus* – profile of an organism.  
J. Med. Microbiol. **18**: 139-166.
- ROTTA, J., 1986:**  
Pyogenic hemolytic streptococci.  
In: Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., and Holt, J. G. (eds.)  
Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.  
Williams & Wilkins, Baltimore, USA, Vol. 2: 1047-1063.
- ROTSCHIEDT, W. und WINKELMANN, J., 1991:**  
Untersuchung der Viertelgemelte von Erstkalbinnen auf B-Streptokokken auf Zuchtvieh-Absatzveranstaltung des Rheinischen Verbandes für Schwarzbuntrinderzucht (RVS).  
Dtsch. Tierärztl. Wschr. **98**: 410-411.
- ROUSSET, A., TYTGAT, F., and MINCK, R., 1979:**  
The importance of Lancefield group B streptococci (*S. agalactiae*) in gynaecology and obstetrics.  
J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod. **8**: 219-221.
- RÜHLMANN, J., KRUFF, V., WITTMANN-LIEBOLD, B., and FEHRENBACH, F. J., 1989:**  
Sequence similarity between protein B and human apolipoprotein A-IV.  
FEMS Lett. **249**: 151-154.
- RULLMANN und TROMMSDORF, 1906:**  
Arch. Hyg. **59**: 224.  
zitiert nach MAJERT, 1931.
- RUSSEL, H., and NORCROSS, N. L., 1972:**  
The isolation and some physiochemical and biologic properties of the type III antigen of group B streptococci.  
J. Immunol. **109**: 90-96.
- SAIKI, R. K., SCHARF, S. J., FALOONA, F., MULLIS, K.B., HORN, G.T., ERLICH, H. A., and ARNHEIM, N., 1985:**  
Enzymatic amplification of betaglobin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.  
Science **230**: 1350-1354.
- SAIKI, R. K., GELFAND, D. H., STOFFEL, S., SCHARF, S. H., HIGUCHI, R., HORN, G. T., MULLIS, K. B., and ERLICH, H. A., 1988:**  
Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.  
Science **239**: 487-491.

- SALASIA, S. I. O., WIBAWAN, I. W. T., LÄMMLER, CH., and SELLIN, M., 1994:**  
Phase variation in streptococci of serological group B. Characteristic properties of isolates from human and bovine infection.  
APMIS **102**: 925-930.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., and MANIATIS, T., 1989:**  
In: Molecular cloning: A laboratory manual.  
Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA, 2th ed., vol. 1.
- SARGEANT, J. M., SCOTT, H. M., LESLIE, K. E., IRELAND, M. J., and BASHIRI, A., 1998:**  
Clinical mastitis in dairy cattle in Ontario: frequency of occurrence and bacteriological isolates.  
Can. Vet. J. **39**: 33-38.
- SCHLEIFER, K. H., and KILPPER-BÄLZ, R., 1984:**  
Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov.  
Int. J. Syst. Bacteriol. **34**: 31-34.
- SCHLEIFER, K. H., KRAUS, J., DVORAK, C., KILPPER-BÄLZ, R., COLLINS, M. D., and FISCHER, W., 1985:**  
Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov.  
System. Appl. Microbiol. **6**: 183-195.
- SCHLEIFER, K. H., and KILPPER-BÄLZ, R., 1987:**  
Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci, enterococci and lactococci: a review.  
System. Appl. Microbiol. **10**: 1-19.
- SCHNEEWIND, O., FRIEDRICH, K., and LÜTTICKEN, R., 1988:**  
Cloning and expression of the CAMP factor of group B streptococci in *Escherichia coli*.  
Infect. Immun. **56**: 2174-2179.
- SCHNORF, C., 1925:**  
Schweiz. Arch. Tierhkl. **67**  
zitiert nach MAJERT, 1931.
- SCHÖCHLI, E., 1926:**  
Schweiz. Arch. Tierhkl. **68**  
zitiert nach MAJERT, 1931.
- SCHÖNBERG, F., 1950:**  
Über Maßnahmen zur Erreichung möglichst keimarmer und bekömmlicher Trinkmilch.  
Vorträge zum Hochschultag der Tierärztlichen Hochschule Hannover.  
Verlag M. & H. Schaper, Hannover.
- SCHUCHAT, A., 1998:**  
Epidemiology of group B streptococcal diseases in the United States: shifting paradigms.  
Clin. Microbiol. Rev. **11**: 497-513.
- SCHUCHAT, A., 1999:**  
Group B *Streptococcus*.  
Lancet **353**: 51-56.
- SCHULZ, J., 1994:**  
Erkrankungen der Milchdrüse des Rindes: Grundsätze.  
In: Wendt, K., Bostedt, H., Mielke, H. und Fuchs, H.-W. (Hrsg.)  
Euter- und Gesäugekrankheiten.  
Gustav Fischer Verlag, Jena / Stuttgart: 226-301.
- SCHWARTZ, B., SCHUCHAT, A., OXTOBY, M. J., COCHI, S., HIGHTOWER, A., and BROOME, C. V., 1991:**  
Invasive group B streptococcal disease in adults.  
JAMA **266**: 1112-1114.



**SCHWARZ, S., CARDOSO, M., and WEGENER, H. C., 1992:**

Nucleotide sequence and phylogeny of the *tet(L)* tetracycline resistance determinant encoded by plasmid pSTE1 from *Staphylococcus hyicus*.  
Antimicrob. Agents Chemother. **36**: 580-588.

**SCHWARZ, S., WIBAWAN, I. W. T., and LÄMMLER, CH., 1994:**

Distribution of genes conferring combined resistance to tetracycline and minocycline among group B streptococcal isolates from humans and various animals.  
Zbl. Bakt. **281**: 526-533.

**SCHWARZ, S., and WERCKENTHIN, CH., 1997:**

Molecular biology and molecular diagnostics of antibiotic resistance genes.  
Proceedings of the 7<sup>th</sup> International Symposium "Animal research and biomedical science", Seoul, 128-135.

**SCHWARZ, S. und WERCKENTHIN, CH., 1998:**

Nachweismöglichkeiten, Vorkommen und Ausbreitung antibiotischer Resistenzgene bei Staphylokokken.  
Tierärztl. Umsch. **53**: 314-318.

**SEELEMANN, M., 1932a:**

Die Streptokokkeninfektionen des Euters.  
Verlag Schaper, Hannover.

**SEELEMANN, M., 1932b:**

Experimente und Beobachtungen an Milchkühen im Rahmen der Galtforschung. III. Mitteilung: Beitrag zur erfolgreichen Behandlung der Streptokokkeninfektionen des Euters mit Rivanol.  
Arch. Tierhkl. **62**: 83.

**SEELEMANN, M., 1932c:**

Experimente und Beobachtungen an Milchkühen im Rahmen der Galtforschung. II. Mitteilung: Beitrag zur Frage des Wertes der sogenannten Ausmelkmethode.  
Arch. Tierhkl. **64**: 530.

**SEELEMANN, M., 1948:**

Biologie der bei Tieren und Menschen vorkommenden Streptokokken.  
zitiert nach URBASCHEK, 1951.

**SEELEMANN, M., 1954:**

Biologie der Streptokokken.  
Verlag Hans Carl, Nürnberg, 2. Auflage

**SEELEMANN, M. und OBIGER, G., 1958:**

Über die Herstellung gruppenspezifischer Seren zur Streptokokken-Differenzierung.  
Zschr. Hyg. **144**: 503.

**SEELEMANN, M., 1963:**

Zur Frage der Pathogenität des *Streptococcus agalactiae* (Galtstreptokokken) und der Gesundheitsschädlichkeit der Milch von mastitiskranken Kühen für den Menschen.  
Monatsh. Tierhkl. **15**: 199-210.

**SELBITZ, H. J., 1992:**

Lehrbuch der veterinärmedizinischen Bakteriologie.  
Gustav Fischer Verlag, Jena / Stuttgart.

**SHERMAN, J. M., 1937:**

The Streptococci.  
Bacteriol. Rev. **1**: 3-97.

**SHERMAN, J. M., and OBIGER, G., 1938:**

The hemolytic streptococci of milk.  
J. Infect. Dis. **62**: 190-201.

**SHIMZU, K., 1958:**

Bacteriological studies on streptococci from bovine udder.  
I. Serological and biochemical observations on group B streptococci and a general description of streptococci from bovine milk in Hokkaido.

- Jpn. J. Vet. Res. **6**: 209-225.
- SISCHO, W. M., HEIDER, L. E., MILLER, G. Y., and MORE, D. A., 1993:**  
Prevalence of contagious pathogens of bovine mastitis and use of mastitis control practices.  
J. Am. Vet. Med. Assoc. **202**: 595-600.
- SKALKKA, B., and SMOLA, J., 1981:**  
Lethal effect of CAMP-factor and UBERIS-factor - a new finding about diffusible exosubstances of *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus uberis*.  
Zbl. Bakt. Hyg. **249**: 190-194.
- SMOLA, J., 1993:**  
Some characteristics of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from man, cattle, pig and nutria.  
XII. Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases, 6.-10. 9. 1993, St. Petersburg, Russia.
- SOBIRAJ, A., ILLING, C., FRIEBEL, H., BARTEL, K. und RICHTER, A., 2000:**  
Heilungsrate bei Kühen mit subklinischer und unspezifischer Mastitis durch den Einsatz von antibiotikahaltigen Langzeitpräparaten zum Zeitpunkt des Trockenstellens, gleichzeitig eine Vergleichsstudie.  
Tierärztl. Umsch. **55**: 315-320.
- SOEDARMANTO, I., SCHWARZ, S., LIEBISCH, B., and LÄMMLER, CH., 1995:**  
Tetracyclin resistance determinants among streptococci of serological group G and L.  
Vet. Microbiol. **45**: 331-337.
- SOEDARMANTO, I., PASARIBU, F. H., WIBAWAN, I. W. T., and LÄMMLER, CH., 1996:**  
Identification and molecular characterization of serological group C streptococci isolated from diseased pigs and monkeys in Indonesia.  
J. Clin. Microbiol. **34**: 2201-2204.
- SPELLERBERG, B., 2000:**  
Pathogenesis of neonatal *Streptococcus agalactiae* infections.  
Microb. Infect. **2**: 1733-1742.
- SPELLERBERG, B., MARTIN, S., FRANKEN, C., BERNER, R., and LÜTTICKEN, R., 2000:**  
Identification of a novel insertion sequence element in *Streptococcus agalactiae*.  
Gene **241**: 51-56.
- STADTFELD, H., 1979:**  
Vergleichende Untersuchungen zum kulturellen Nachweis von *Streptococcus agalactiae* unter besonderer Berücksichtigung CO<sub>2</sub>-dependenter Stämme.  
Inauguraldissertation bei dem Fachbereich Veterinärmedizin und Tierzucht der Justus-Liebig-Universität Gießen.
- STÅLHAMMAR-CARLEMALM, M., STENBERG, L., and LINDAHL, G., 1993:**  
Protein Rib: a novel group B streptococcal cell surface protein that confers protective immunity and is expressed by most stains causing invasive infections.  
J. Exp. Med. **177**: 1593-1603.
- STÅLHAMMAR-CARLEMALM, M., ARESCHOUG, T., LARSSON, C., and LINDAHL, G., 2000:**  
Cross-Protection between group A and B streptococci due to cross-reacting surface proteins.  
J. Infect. Dis. **182**: 142-149.
- STEINER, B., ROMERO-STEINER, S., CRUCE, D., and GEORGE, R., 1997:**  
Cloning and sequencing of the hyaluronate lyase gene from *Propionibacterium acnes*.  
Can. J. Microbiol. **43**: 315-321.
- SÜPFLE, K. und HOFMANN, P., 1927:**  
Münch. Tierärztl. Wschr. **78**: 201.  
zitiert nach MAJERT, 1931.

- SUGAHARA, K., SCHWARTZ, N. B., and DORFMAN, A., 1979:**  
Biosynthesis of hyaluronic acid by *Streptococcus*.  
J. Biol. Chem. **254**: 6252-6261.
- TAKAHASHI, S., ADDERSON, E. E., NAGANO, Y., NAGANO, N., BRIESACHER, M. R., and BOHNSACK, J. F., 1998:**  
Identification of a highly encapsulated, genetically related group of invasive type III group B streptococci.  
J. Infect. Dis. **177**: 1116-1119.
- TAPSALL, J. W., and PHILLIPS, E. A., 1987:**  
Presumptive identification of group B streptococci by rapid detection of CAMP factor and pigment production.  
Diagn. Microbiol. Infect. **7**: 225-228.
- TENOVER, F. C., ARBEIT, R. D., GOERING, R. V., MICKELSEN, P. A., MURRAY, B. E., PERSING, D. H., and SWAMINATHAN, B., 1995:**  
Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing.  
J. Clin. Microbiol. **33**: 2233-2239.
- THAL, E. und OBIGER, G., 1969:**  
Das CAMP-Phänomen des *S. agalactiae* in der neuen serologischen Streptokokkengruppe „U“ sowie weiterer Bakterienarten.  
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **82**: 126-130.
- THIELE, D., WILLEMS, H., KÖPF, G., and KRAUSS, H., 1993:**  
Polymorphism in DNA restriction patterns of *Coxiella burnetii* isolates investigated by pulsed field gel electrophoresis and image analysis.  
Eur. J. Epidemiol. **29**: 419-425.
- TIEFENTHALER, A., 1995:**  
Chronisch-katarrhalische Mastitis des Rindes und ihre homöopathisch-biologische Behandlung.  
Berl. Tierärztl. Mhefte. **12**: 112-121.
- TILSALA-TIMISJÄRVI, A., FORSMAN, P., and ALATOSSAVA, T., 2000:**  
Bovine mastitis diagnosis from milk by a polymerase chain reaction-based method.  
J. Nutri. Res. Food Sci. **55**: 488-492.
- TISSI, L., VON HUNOLSTEIN, C., BISTONI, F., MARANGI, M., PARISI, L., and OREFICI, G., 1998:**  
Role of group B streptococcal capsular polysaccharides in the induction of septic arthritis.  
J. Med. Microbiol. **47**: 717-723.
- TODD, E. A., 1934:**  
A comparative serological study of streptolysins derived from human and animal infections with note on pneumococcal hemolysin, tetanolysin and streptococcal toxin.  
J. Pathol. Bacteriol. **39**: 299-321.
- TROLLDENIER, H., 1996:**  
Resistenzentwicklung von Infektionserregern landwirtschaftlicher Nutztiere in Deutschland (1990-1994) - ein Überblick.  
Dtsch. Tierärztl. Wschr. **103**: 256-260.
- TROLLDENIER, H., 1997:**  
Resistenzenerfassung und -auswertung in der Veterinärmedizin.  
Bundesgesundhbl. **11**: 431.
- URBASCHKE, B., 1951:**  
Über die Biologie des *Sc. agalactiae s. mastitidis*.  
Inauguraldissertation bei der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- VANDAMME, P., DEVRIESE, L. A., POT, B., KERSTERS, K., and MELIN, P., 1997:**  
*Streptococcus difficile* is a nonhemolytic group B, type Ib *streptococcus*.  
Int. J. Syst. Bacteriol. **47**: 81-85.

**van den HEEVER, L. W., and ERASMUS, M., 1980:**

Group B *Streptococcus*-comparison of *Streptococcus agalactiae* isolated from humans and cows in the Republic of South Africa.

J. S. Afr. Vet. Assoc. **51**: 93-100.

**van den HEEVER, L. W., and GIESECKE, W. H., 1980:**

Experimental induction of bovine mastitis with human strains of group B streptococci (*Streptococcus agalactiae*).

J. S. Afr. Vet. Assoc. **51**: 107-109.

**VOLLMAN, J. H., SMITH, W. L., BALLARD, E. T., and LIGHT, I. J., 1976:**

Early onset group B streptococcal disease: clinical, roentgenographic, and pathologic features.

J. Pediatr. **89**: 199-203.

**von HUNOLSTEIN, C., D'ASCENZI, S., WAGNER, B., JELINKOVA, J., ALFARONE, G., RECCHIA, S., WAGNER, M., and OREFICI, G., 1993:**

Immunochemistry of capsular type polysaccharide and virulence properties of type VI *Streptococcus agalactiae* (group B streptococci)

Infect. Immun. **61**: 1272-1280.

**von HUNOLSTEIN, C., PARISI, L., TISSI, L., RECCHIA, S., ALFARONE, G., NICOLINI, L., VOLPE, C., WAGNER, B., MOTLOVA, J., and OREFICI, G., 1999:**

Virulence properties of type VII *Streptococcus agalactiae* (group B streptococci) and immunochemical analysis of capsular type polysaccharide.

J. Med. Microbiol. **48**: 983-990.

**von OSTERTAG, R., 1934:**

zitiert nach KIELWEIN, 1994.

**VOTAVA, M., TEJKALOVÁ, M., DRÁBKOVÁ, M., UNZEITIG, V., and BRAVENY, I., 2001:**

Use of GBS media for rapid detection of group B streptococci in vaginal and rectal swabs from women in labour.

Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **20**: 120-122.

**WÄSTFELD, M., STALHAMMER-CARLEMALM, M., DELISSE, A. M., CABEZON, T., and LINDAHL, G., 1996:**

Identification of a family of streptococcal surface proteins with extremely repetitive structure.

J. Biol. Chem. **271**: 18892-18897.

**WAGNER, B., MURAI, T., WAGNER, M., GÜNTHER, E., and JELINKOVA, J., 1994:**

JM9 strains, a new type of group B streptococci from Japan.

Zbl. Bakt. **280**: 488-496.

**WAGNER, H., 1934:**

Versuche zur Bekämpfung des gelben Galts mittels der Entozonspülung.

Inauguraldissertation bei der Veterinärmedizinischen Fakultät der Hessischen Ludwigs-Universität zu Gießen.

**WAITKINS, S. A., 1980:**

Evaluation of rapid methods of identifying group B streptococci.

J. Clin. Pathol. **33**: 302-305.

**WANG, S. M., DEIGHTON, M. A., CAPSTICK, J. A., and GERRATY, N., 1999:**

Epidemiological typing of bovine streptococci by pulsed-field gel electrophoresis.

Epidemiol. Infect. **123**: 317-324.

**WANGER, A. R., and DUNNY, G. M., 1985:**

Development of a system for genetic and molecular analysis of *Streptococcus agalactiae*.

Res. Vet. Sci. **38**: 202-208.

**WATTS, P. S., 1945:**

J. Path. Bacteriol., Vol. LVII, **2**

zitiert nach GROSSENBACHER, 1951.

**WATTS, J. L., and OWENS, W. E., 1987:**

Synergistic hemolysis associated with coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mammary glands.

J. Clin. Microbiol. **25**: 2037-2039.

**WEAVER, L. D., GALLAND, J., MARTIN, P. A. J., and VERSTEEG, J., 1986:**

Treatment of *Streptococcus agalactiae* mastitis in dairy cows: Comparative efficacies of two antibiotic preparations and factors associated with successful treatment.

J. Am. Vet. Med. Assoc. **189**: 666-669.

**WEISER, J. N., and RUBENS, C. E., 1987:**

Transposon mutagenesis group B *Streptococcus* beta-hemolysis biosynthesis.

Infect. Immun. **55**: 2314-2316.

**WENDT, K., 1998:**

In: Wendt, K., Lotthammer, K.-H., Fehlings, K. und Spohr, M. (Hrsg.)

Handbuch Mastitis

Kluge Verlag: 95-98, 149, 163-164.

**WENNERSTRÖM, D. E., TSAIHONG, J. C., and CRAWFORD, J. T., 1985:**

Evaluation of the role of hemolysin and pigment in pathogenesis of early onset group B streptococcal infection.

In: KIMURA, Y., KOTAMI, S., and SHIAKAWA, Y., (eds.)

Recent Advances in Streptococci and Streptococcal Diseases.

Reedbooks Ltd., Bracknell, Berkshire: 155-156.

**WERNER, A. H., GIBSON, M. D., and JAQUEST, R., 1951:**

Specificities of hyaluronidase formed by several groups of streptococci.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **76** : 585-587.

**WESSELS, M. R., POZSGAY, V., KASPER, D. L., and JENNINGS, H. L., 1987:**

Structure and immunochemistry of an oligosaccharide repeating unit of the capsular polysaccharide of type III group B *Streptococcus*. A revised structure for the type III group B streptococcal polysaccharide antigen.

J. Biol. Chem. **262**: 8262-8267.

**WESSELS, M. R., RUBENS, C. E., BENEDI, V. J., and KASPER, D. L., 1989:**

Definition of a bacterial virulence factor: sialylation of the group B streptococcal capsule.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**: 8983-8987.

**WESSELS, M. R., HAFT, R. F., HEGGEN, L. M., and RUBENS, C. E., 1992:**

Identification of a genetic locus essential for capsule sialylation in type III group B *Streptococcus*.

Infect. Immun. **60**: 1042-1045.

**WESSELS, M. R., and KASPER, D. L., 1993:**

The changing spectrum of group B streptococcal disease.

New Engl. J. Med. **328**: 1843-1844.

**WESSELS, M. R., 1997:**

Biology of streptococcal capsular polysaccharides.

J. Appl. Microbiol. Sympos. Suppl. **83**: 20S-31S.

**WHILEY, R. A., DUKE, B., HARDIE, J. M., and HALL, L. M. C., 1995:**

Heterogeneity among 16S-23S rRNA intergenic spacers of species within the "*Streptococcus milleri* group".

Microbiol. **141**: 1461-1467.

**WIBAWAN, I. W. T., and LÄMMLER, CH., 1990a:**

Distribution of B streptococcal type antigens among streptococci of serological groups B, G and L.

Zbl. Bakt. **273**: 471-477.

**WIBAWAN, I. W. T., and LÄMMLER, CH., 1990b:**

Properties of streptococci of serological group B with protein surface antigens X and R.

J. Clin. Microbiol. **25**: 2834-2836.

- WIBAWAN, I. W. T., and LÄMMLER, CH., 1991a:**  
Isolation and characterization of group B streptococcal type antigens X and R.  
*Zbl. Bakt.* **275**: 327-334.
- WIBAWAN, I. W. T., and LÄMMLER, CH., 1991b:**  
Influence of capsular neuraminic acid on properties of streptococci of serological group B.  
*J. Gen. Microbiol.* **137**: 2721-2725.
- WIBAWAN, I. W. T., LAUTROU, Y., and LÄMMLER, CH., 1991:**  
Antibiotic resistance patterns and pigment production of streptococci of serological group B isolated from bovines and humans.  
*J. Vet. Med.* **38**: 731-736.
- WIBAWAN, I. W. T., and LÄMMLER, CH., 1992:**  
Relationship between group B streptococcal serotypes and cell surface hydrophobicity.  
*J. Vet. Med.* **39**: 2721-2725.
- WIBAWAN, I. W. T., GRÖLZ-KRUG, S., and LÄMMLER, CH., 1992a:**  
Role of hydrophobic surface proteins in mediating adherence of group B streptococci to epithelial cells.  
*J. Gen. Microbiol.* **138**: 1237-1242.
- WIBAWAN, I. W. T., LÄMMLER, CH., LAUTROU, Y., and WARSA, U. CH., 1992b:**  
Serotyping and further characterization of group B streptococcal isolates from Indonesia.  
*Zbl. Bakt.* **277**: 260-266.
- WIBAWAN, I. W. T., 1993:**  
Typenantigene von Streptokokken der serologischen Gruppe B und deren Bedeutung als Virulenzfaktoren.  
Inauguraldissertation beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.
- WIBAWAN, I. W. T., LÄMMLER, CH., and SMOLA, J., 1993a:**  
Properties and type antigen patterns of group B streptococcal isolates from pigs and nutrias.  
*J. Clin. Microbiol.* **31**: 762-764.
- WIBAWAN, I. W. T., LÄMMLER, CH., SELEIM, R. S., and PASARIBU, F. H., 1993b:**  
A haemagglutinating adhesin of group B streptococci isolated from cases of bovine mastitis mediates adherence to HeLa cells.  
*J. Gen. Microbiol.* **139**: 2173-2178.
- WILKINSON, H. W., and MOODY, M. D., 1969:**  
Serological relationships of type I antigens of group B streptococci.  
*J. Bact.* **97**: 629-634.
- WILKINSON, H. W., and EAGON, R. G., 1971:**  
Type-specific antigens of group B type Ic streptococci.  
*Infect. Immun.* **4**: 596-604.
- WILKINSON, H. W., 1972:**  
Comparison of streptococcal R antigen.  
*Appl. Microbiol.* **24**: 669-670.
- WILKINSON, H. W., FACKLAM, R. R., and WORTHAM, E. C., 1973:**  
Distribution of serological type of group B streptococci isolated from a variety of clinical material over a five-year period.  
*Infect. Immun.* **8**: 228-235.
- WILKINSON, H. W., 1975:**  
Immunochemistry of purified polysaccharide type antigens of group B streptococcal types Ia, Ib, and Ic.  
*Infect. Immun.* **11**: 845-852.
- WILKINSON, H. W., 1977:**  
Nontypable group B streptococci isolated from human sources.  
*J. Clin. Microbiol.* **6**: 183-184.

**WILKINSON, H. W., 1978:**

Group B streptococcal infection in humans.  
Annu. Rev. Microbiol. **32**: 41-57.

**WILSON, C. D., and SALT, G. F. H., 1978:**

Streptococci in animal disease.  
In: Skinner, F. A., and Quesnel, L. B. (eds.)  
Streptococci.  
Society Appl. Bacteriol. Sympos. Series **7**: 143-156.

**WINKLE, S., 1979:**

Mikrobiologische und serologische Diagnostik.  
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart / New York, 3. Auflage.

**WITTKOWSKI, G., FEHLINGS, K., KRABISCH, P. und GANGL, A., 1999:**

Zur Resistenzentwicklung von Mastitisserregern in Bayern.  
Tagung des Arbeitskreises „Eutergesundheit“ der Deutschen Veterinärmedizinischen  
Gesellschaft e. V. vom 27.-28.05.1999 in Hannover, Tagungsbericht: 86-93.

**WOLTER, W., KLOPPERT, B. und ZSCHÖCK, M., 1999:**

Verbreitung und Bekämpfung von *S. agalactiae* in Hessen.  
Tagungsbericht des 23. Kongresses der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft  
e. V. vom 13.-16.04.1999 in Bad Nauheim: 640-648.

**YAMAGATA, M., GOODGER, W. J., WEAVER, L., and FRANTI, C., 1987:**

The economic benefit of treating subclinical *Streptococcus agalactiae* mastitis in  
lactating cows.  
J. Am. Vet. Med. Assoc. **191**: 1556-1561.

**YAMAMOTO, T., NAGASAWA, I., NOJIMA, M., YOSHIDA, K., and KUWABARA, Y., 1999:**

Sexual transmission and reinfection of group B streptococci between spouses.  
J. Obstet. Gynaecol. Res. **25**: 215-219.

**YANCEY, R. J., 1993:**

Recent advances in bovine vaccine technology.  
J. Dairy Sci. **76**: 2418-2436.

**YANCEY, R. J., 1999:**

Vaccines and diagnostic methods for bovine mastitis: fact and fiction.  
Adv. Vet. Med. **41**: 257-273.

**YILDIRIM, A. Ö., LÄMLER, CH., and WEISS, R., 2002:**

Identification and characterization of *Streptococcus agalactiae* isolated from horses.  
Vet. Microbiol. **85**: 31-35.

**YILDIRIM, A. Ö., 2002:**

Phäno- und Genotypisierung von Streptokokken der serologischen Gruppe B  
unterschiedlicher Herkunft.  
Inauguraldissertation beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität  
Gießen.

**YOSHIDA, K., 1971:**

Demonstration of serologically different capsular types among strains of *Staphylococcus aureus* by serum-soft agar technique.  
Infect. Immun. **3**: 535-539.

**YOUNAN, M., ALI, Z., MÜLLER, W., and BORNSTEIN, S., 1999:**

*Streptococcus agalactiae* infection in camels in Kenya (*Camelus dromedarius*).  
Atelier International sur le Chamelon (CIRAD-EMVT), Ouarzazate, 24.-26.10.1999

**YOUNAN, M., ALI, Z., BORNSTEIN, S., and MULLER, W., 2001:**

Application of the California mastitis test in intramammary *Streptococcus agalactiae* and  
*Staphylococcus aureus* infections of camels (*Camelus dromedarius*) in Kenya.  
Prev. Vet. Med. **51**: 307-316.

**ZALEZNIK, D. F., RENCH, M. A., HILLIER, S., KROHN, M. A., PLATT, R., LEE, M. L., FLORES, A. E., FERRIERI, P., and BAKER, C. J., 2000:**

Invasive disease due to group B *Streptococcus* in pregnant women and neonates from diverse population groups.

Clin. Infect. Dis. **30**: 276-281.

**ZECCONI, A., and SMITH, K. L., 2000:**

IDF Position paper on ruminant mammary gland immunity.

Symposium on immunology of ruminant mammary gland, Stresa, Italy, 11.-14.06.2000: 19-97.

**ZIEGER, 1932:**

Beiträge zur Streptokokken-Mastitis.

Vet. Med. Jahresber. **40**: 17-21.

**ZSCHOKKE, E., 1893:**

Beitrag zur Kenntnis des Gelben Galtes.

Landw. Jahrb. Schweiz **7**: 200.



## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Ch. Lämmle danke ich für die Überlassung des Dissertationsthemas, seine stets gewährte Hilfe während der Entstehung dieser Arbeit sowie für die wiederholte, geduldige und zügige Durchsicht des Manuskripts.

Darüber hinaus danke ich dem geschäftsführenden Direktor des Instituts für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, Herrn Prof. Dr. M. Bülte, sowie den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der ehemaligen Abteilung „Milchhygiene“, insbesondere Frau H. Müller.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Dr. J. Brückler für die wertvollen Vorschläge zur Verbesserung des Manuskripts.

Frau Dr. B. Kloppert und Herrn Dr. M. Zschöck vom Staatlichen Untersuchungsamt Hessen danke ich für die überaus freundliche Hilfsbereitschaft.

Insbesondere möchte ich mich bei meinen Mitstreitern im Ringen um den Dokortitel für ihre stete Unterstützung und Ermunterung bedanken, v. a. bei Amir Abdulmawjood, Ali Önder Yildirim, Michaela Rosenboom, Abdulwahed Ahmed Hassan, Arndt Vossen, Izhar Ul Haq Khan, Cosima Annemüller, Indarjulianto Soedarmanto, Isrina Oktavia Salasia, Fachriyan Pasaribu und I Wayan Teguh Wibawan.

Frau Dr. A. Renz-Schauen, Professur für Milchwissenschaften des Instituts für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, möchte ich für die mir stets vermittelte Zuversicht danken.

Mein herzlichster Dank gilt meiner Familie, die mich während des Entstehens dieser Arbeit immer wieder ermutigt und unterstützt hat.

